

Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.

Traunstein

(Geschäftsstellenleiter: Dr. F. Meinel)

und

aus dem Institut für Hygiene und Technologie

der Lebensmittel tierischen Ursprungs

(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)

der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Zur Differenzierung Aeskulin-negativer euterpa-  
thogener Streptokokken mit Hilfe biochemischer  
und serologischer Methoden im Routinelabor

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Angelika Richter-Meerwald  
aus  
Bischofswiesen

München 1980



Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.

Traunstein

(Geschäftsstellenleiter: Dr. F. Meinel)

und

aus dem Institut für Hygiene und Technologie

der Lebensmittel tierischen Ursprungs

(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)

der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Zur Differenzierung Aeskulin-negativer euterpa-  
thogener Streptokokken mit Hilfe biochemischer  
und serologischer Methoden im Routinelabor

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Angelika Richter-Meerwald

aus

Bischofswiesen

München 1980

Richter-Meerwald Angelika

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen  
Fakultät der Universität München



Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 25. Juli 1980

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

|       |                                                                                                                      |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Einleitung                                                                                                           | 1  |
| 2.    | Literatur                                                                                                            | 2  |
| 2.1   | Bedeutung der Streptokokken als Mastitiserreger                                                                      | 2  |
| 2.1.1 | Streptokokken der serologischen Gruppe B                                                                             | 3  |
| 2.1.2 | Streptokokken anderer serologischer Gruppen                                                                          | 6  |
| 2.2   | Diagnostik euterpathogener Streptokokken                                                                             | 9  |
| 2.2.1 | Morphologie                                                                                                          | 10 |
| 2.2.2 | Haemolyseformen                                                                                                      | 11 |
| 2.2.3 | Aeskulinspaltung                                                                                                     | 12 |
| 2.2.4 | CAMP-Test                                                                                                            | 12 |
| 2.2.5 | Hippurat-Test                                                                                                        | 14 |
| 2.2.6 | Bacitracinempfindlichkeit                                                                                            | 15 |
| 2.2.7 | Pigmentbildung                                                                                                       | 16 |
| 2.2.8 | Serologische Differenzierung                                                                                         | 17 |
| 3.    | Eigene Untersuchungen                                                                                                | 25 |
| 3.1   | Material                                                                                                             | 25 |
| 3.2   | Methoden                                                                                                             | 26 |
| 3.2.1 | CAMP-Test                                                                                                            | 27 |
| 3.2.2 | Hippuratspaltung                                                                                                     | 27 |
| 3.2.3 | Bacitracinempfindlichkeit                                                                                            | 27 |
| 3.2.4 | Pigmentbildung                                                                                                       | 28 |
| 3.2.5 | Serologische Differenzierung                                                                                         | 28 |
| 3.3   | Ergebnisse                                                                                                           | 30 |
| 3.3.1 | Haemolyseformen                                                                                                      | 30 |
| 3.3.2 | CAMP- und Hippurat-Test                                                                                              | 30 |
| 3.3.3 | Pigmentbildung und Bacitracinempfindlichkeit<br>der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken | 31 |
| 3.3.4 | Serologische Differenzierung                                                                                         | 32 |
| 4.    | Diskussion                                                                                                           | 33 |
| 5.    | Zusammenfassung /Summary                                                                                             | 44 |
| 6.    | Literaturverzeichnis                                                                                                 | 46 |

## 1. Einleitung

Die Bedeutung der Galtstreptokokken als Angehörige der serologischen Gruppe B wird seit einigen Jahren verstärkt diskutiert, zumal u.a. aufgrund von Erhebungen die Vermutung nahe liegt, daß eine Übertragung der auch für den Menschen pathogenen B-Streptokokken vom Tier auf den Menschen über das Lebensmittel Milch in Betracht kommt. Der Charakter der durch die B-Streptokokken beim Menschen hervorgerufenen Erkrankungen läßt zwar den Kausalnexus zu den Keimen in der Milch nicht erkennen, dennoch muß die Gefahr für die Gesundheit der Konsumenten von Milch in Erwägung gezogen und ihr mit wirksamen Maßnahmen begegnet werden. Nach wie vor sind die Galtstreptokokken die ansteckendsten Euterentzündungserreger, so daß insbesondere im Hinblick auf die Bekämpfung dieser Euterinfektion die Identifizierung erforderlich ist. Eine sichere Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B muß auch im Routine-Laborbetrieb durchführbar sein.

Im Zuge der langjährigen Erfahrung des Eutergesundheitsdienstes des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V. hat sich der Verdacht ergeben, daß die z.Zt. zur Identifizierung des Gelben Galters (*Sc.agalactiae*) im Routinelabor angewendeten Methoden, wie CAMP-Test und Hippuratspaltungstest, nicht ausreichen, um alle zur serologischen Gruppe B gehörenden euterpathogenen Streptokokken zu erfassen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit fast 400 Aeskulin-negative Streptokokken-Stämme, die aus Milchproben isoliert und mit Hilfe von CAMP- und Hippurats-Test nicht einwandfrei identifizierbar waren, weiteren biochemischen Differenzierungskriterien unterworfen und auch serologisch untersucht. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob die relativ aufwendige serologische Untersuchung im Vergleich zu den biochemischen Tests wesentliche Mehrinformation bringt.

## 2. Literatur

### 2.1 Bedeutung der Streptokokken als Mastitiserreger

Streptokokken haben bei der Entstehung von Mastitiden große Bedeutung. Untersuchungen von DODD und NEAVE (1970) haben ergeben, daß der Anteil der Streptokokken an Euterinfektionen ca. 35 % beträgt. Nach Untersuchungen von HERTEL (1975), die in verschiedenen Viehbeständen in West- und Osteuropa unter variablen Bedingungen durchgeführt wurden, waren an den Gesamtinfektionen die Streptokokken mit 40,6 % beteiligt. Davon entfielen 22,9 % auf "Nicht-Galtstreptokokken", 17,7 % auf Galtstreptokokken. LEIDEL und RICHTER (1975) untersuchten 440 Milchproben, von denen 437 (99,32 %) mit Bakterien kontaminiert waren. Der Anteil der CAMP-negativen Streptokokken betrug dabei 53,09 %, derjenige der Galtinfektionen nur 2,06 %. Ungarische Untersuchungen (FASCAR, 1977) im Zeitraum von 1973-1975 lassen erkennen, daß sich der Anteil der Streptokokkeninfektionen von 70,3 % im Jahre 1973 und 77,6 % im Jahre 1974 auf 45,3 % im Jahre 1975 verringert hat. Auch NIELAND (1978) spricht von einer Abnahme der Streptokokkeninfektionen. LUBENOW (1975) hat bei Untersuchungen von Viertelgemelksproben, die aber nur aus zwei Beständen stammten, eine Beteiligung der Streptokokken von nur 8,2 % festgestellt.

Unterschiede in bezug auf die Beteiligung der Streptokokken bestehen auch im Hinblick auf die Laktationsstadien. So wurden bei LUBENOW (1975) in der Trockenperiode 7,8 % der Euter- viertel neu infiziert, in der Laktationsperiode 35,5 %. Bei diesen Neuinfektionen waren in der Laktationsperiode die Streptokokken zu 47,4 % beteiligt, in der Trockenperiode jedoch nur zu 26,3 %. WEIGT und AHLERS (1978) stellen fest, daß im späten Trockenstadium Streptokokken zu 29 % an Erkrankungen des Euters partizipierten. Zum Zeitpunkt des Abkalbens betrug der Anteil der Streptokokkeninfektionen 33 %. Die aufgeführten Prozentzahlen beziehen sich hier jedoch nur auf das Erscheinungsbild schwerer Mastitiden.

FURTMAYR und WALSER (1979) fanden bei chronischen Mastitiden 18,7 % Streptokokkeninfektionen.

In den folgenden Kapiteln sollen die für das Rind und den Menschen bedeutendsten Streptokokken verschiedener serologischer Gruppen (Gruppe B sowie die Gruppen A, C und E) behandelt werden.

### 2.1.1 Streptokokken der serologischen Gruppe B

Streptokokken der serologischen Gruppe B können sowohl beim Rind als auch beim Menschen schwere Erkrankungen hervorrufen. Beim Rind stellt der oft latent verlaufende "Gelbe Galt", verursacht durch *Streptococcus agalactiae* (serologische Gruppe B), die ansteckendste Euterkrankheit dar (SEELEMANN, 1954). Nur umfangreiche Bekämpfungsmaßnahmen über einen längeren Zeitraum führen zu einer Senkung der Galtinfektionen. Dies konnte OLSEN (1975) in Dänemark feststellen, wo von 1940 - 1950 noch ca. 30 - 40 % der Herden mit B-Streptokokken infiziert waren, in den Jahren 1955 - 1958 das Vorkommen dagegen auf 10-15 % der Herden gesunken ist und 1975 bei nur mehr 2,5 % lag. Bei Mastitisfällen betrug der Anteil der B-Streptokokken nur 1 %, was OBIGER (1975) auch für Schweden bestätigt. Auch WILSON (1975) konnte nach einer 3 Jahre dauernden Bekämpfungszeit einen Abfall von *Sc.agalactiae*-Infektionen von 8,7 % der infizierten Kühe auf 0,1 % erreichen. Bei Untersuchungen von LEIDEL und RICHTER (1975) in Leipzig lag der Anteil der mit *Sc.agalactiae* kontaminierten Milchproben bei 2,06 %. HERTEL (1975) fand Galtstreptokokken zu 17,7 % an Infektionen beteiligt. MEYER, HESS und BEISSNER (1978) weisen darauf hin, daß nach ihren Untersuchungen 5 % aller Galtstreptokokken CO<sub>2</sub>-abhängig sind und nur bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Spannung erfaßt werden können. Nach RICHTER (1976) lagen in Bayern je nach Herdengröße und Überwachung (Zellzählung, Laborkontrolle der Milchproben) *Sc.agalactiae*-Infektionen bei 11 - 14 % der Herden vor. Im Bereich des Tiergesundheitsdienstes Traunstein sind im Zeitraum von 1976 - 1978 von 775 Galtbetrieben (= 4,9 % aller Milchlieferanten) nur 279 (= 36 %) saniert worden, wobei Galtinfektionen überwiegend im Jahre 1978 ermittelt wurden. Die Vermutung liegt daher sehr nahe, daß diese Euterentzündungserreger wieder stärkere Bedeutung erhalten (TGD Traunstein, 1979).

NEWBOULD (1975) beschreibt *Sc.agalactiae* als einen obligaten Parasiten im Euter der Kuh, wohingegen andere Streptokokken auch in anderen Teilen des Rinderkörpers gefunden werden können oder ubiquitär in der Kuhumgebung sind. Auch für PHILPOT (1975) ist das einzig bekannte Reservoir des *Sc.agalactiae* das infizierte Kuh-Euter. In infizierten Herden konnte er aber den Erreger auch aus der Luft, vom Lagerplatz der Tiere, aus dem Milchgeschirr, von den Melkerhänden und anderen Objekten isolieren und eine Überlebensdauer des *Sc.agalactiae* an Kleidung von 7 Tagen feststellen. Die Übertragung vom Menschen kann durch Melkhygiene wesentlich eingedämmt werden. Laufende Kontrolluntersuchungen und Euterkontrolle auf Zuchtvielmärkten tragen sehr zur Verhütung und Bekämpfung bei, besonders im Hinblick auf Neuinfektionen in sanierten Betrieben durch neu zugekaufte Tiere (DENEKE und KLEINSCHROTH, 1978). BEUCHE, SCHULZ und SCHMIDT (1978) weisen auf Infektionen bei Färsen hin, die als Folge subklinischer Mastitis nach dem Abkalben erhebliche Milchleistungsminderungen bewirken. Eine antibiotische Behandlung der infizierten Viertel dieser Tiere - auch schon vor dem Laktationsbeginn - halten die Autoren für wesentlich zur Sicherung der Eutergesundheit.

Nach Ansicht von HAHN, HEESCHEN und TOLLE (1970) besteht durch den Genuß von Rohmilch ein mittelbarer Kontakt zwischen Mensch und Rind, der eine Infektion des Menschen durch B-Streptokokken-haltige Milch möglich macht, die sich auch von Mensch zu Mensch weiterverbreiten könnte. Vermutungen einer Übertragbarkeit vom Tier auf den Menschen, wie sie z.B. bei den Streptokokken der serologischen Gruppe A beobachtet worden ist, konnten jedoch bisher nicht sicher bestätigt werden (HAHN et al., 1972). McDONALD, McDONALD und ANDERSON (1975) haben 25 B-Streptokokken-Stämme humanen Ursprungs 30 Kühen in verschiedene Milchdrüsenkomplexe injiziert. Von 98 Vierteln zeigten 78,6 % Infektionen. Die Mastitiden verliefen akuter als von bovinen Stämmen verursachte Erkrankungen. Die meisten Infektionen wurden von den Kühen allerdings ohne Antibiotika eliminiert. Die Autoren schließen daraus, daß die humanen Streptokokken-

Stämme pathogener sind als die bovinen. Inwieweit unterschiedliche Biotypen die Ursache dafür sind, ist jedoch noch fraglich. Ebenso meinen die Autoren, daß diese Ergebnisse eigentlich einer Vermutung über Wechselbeziehungen Tier - Mensch widersprechen, bovine Stämme also kaum an menschlichen Infektionen wegen der geringeren Pathogenität beteiligt sind. OBIGER (1964) konnte mit menschlichen B-Streptokokken nur subklinische Mastitiden hervorrufen. B-Streptokokkeninfektionen beim Menschen konnten in Schweden nicht selten beobachtet werden, obwohl der Anteil an Agalactiae-Infektionen an infektiösen Mastitiden nur 1 % beträgt (OBIGER, 1975). Außerdem kommt in Schweden nur pasteurisierte Milch in den Handel. In Übereinstimmung mit anderen Autoren stellt er die "Infektionsquelle Milch" in Frage und hält eine Infektion vom Verdauungstrakt ausgehend nach einer normalen Magenpassage fast für unmöglich. Keimbessiedlungen mit B-Streptokokken sollen also hauptsächlich "von außen her" erfolgen, besonders im Genitaltrakt vor allem bei Störungen des physiologischen Milieus. Von 152 klinisch gesunden Frauen wiesen 36,8 % B-Streptokokken im Genitaltrakt auf. Damit läßt sich auch eine Übertragung Mutter - Kind bei der Passage des Geburtskanals erklären. OBIGER (1975) ist der Meinung, daß Streptokokken der serologischen Gruppe B unabhängig voneinander bei Mensch und Tier vorkommen. Amerikanische Autoren (BADRI et al., 1977) behaupten dagegen, daß anhand ihrer Untersuchungen eine gastrointestinale Besiedlung mit B-Streptokokken ein Reservoir für die vaginale Kontamination darstellt. In Zahlen ausgedrückt bedeutet das, daß von 789 Schwangeren 162 (20,5 %) B-Streptokokken-Trägerinnen waren, wovon 142 (17,9 %) eine anorektale Besiedlung aufwiesen und 81 (10,2 %) eine vaginale. Von 422 Neugeborenen waren 50 (11,8 %) mit B-Streptokokken infiziert. CARREL (1978) stellte fest, daß von 196 Schwangeren kurz vor der Geburt 16 (8,2 %) mit B-Streptokokken infiziert waren, von den 199 Neugeborenen 4 %. Daraus folgt, daß eine mütterliche Besiedlung in 7 von 16 Fällen (= 43 %) Ursache für eine Neugeboreneninfektion war. Die Typisierung zeigte eine Übereinstimmung der mütterlichen und kindlichen Serotypen. 15 (15 %) von 101 nicht schwangeren

Frauen wiesen ebenfalls einen positiven Befund an B-Streptokokken im Genitaltrakt auf. GUENTHER et al. (1978) zeigten in ihren Untersuchungen bei Vaginalabstrichen von Frauen, daß im zweiten Drittel der Schwangerschaft die höchste Rate an B-Streptokokken-Besiedlung besteht, was im Hinblick auf perinatale Erkrankungen berücksichtigt werden muß. LUCAS und ROBERTS (1978) konnten bei Untersuchungen menschlicher Sammelmilch von 25 Spendern über 3 - 4 Tage bei 6 der untersuchten Milchen  $\beta$ -haemolytische Streptokokken der serologischen Gruppe B feststellen. Durch Pasteurisierung bei 62°C für die Dauer von 30 Minuten konnten die Erreger eliminiert werden. Die Autoren können aber anhand ihrer Untersuchungen nicht sicher sagen, ob eine Infektion der Neugeborenen in erster Linie durch die unbehandelte Muttermilch stattfindet oder eher bei der Passage des Geburtskanals (OBIGER, 1975; CARREL, 1978).

#### 2.1.2 Streptokokken anderer serologischer Gruppen

32 % der Mastitiden werden durch andere Streptokokken als *Streptococcus agalactiae* verursacht (EBERHARDT und BUCKALEW, 1977). So gelten neben *S. agalactiae* der *Sc. dysgalactiae* (serologische Gruppe C) und der *Sc. uberis*, dessen Eingruppierung in die serologische Gruppe E aufgrund seiner Reaktion mit E-Serum noch diskutiert wird (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970), als wichtige Euterentzündungserreger beim Rind (BISPING, 1973).

Die Pathogenität des *Sc. dysgalactiae* erstreckt sich im wesentlichen auf Rind und Schaf. Beim Rind führt der Erreger zu Mastitiden, die akut und chronisch verlaufen können (SEELEMANN, 1954), beim Schaf ruft er Metritis und Arthritis hervor (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970). Nach OLSEN (1975) sind 0,5 % der Herden in Dänemark infiziert. WILSON (1975) konnte während einer drei Jahre dauernden Bekämpfungszeit das Auftreten von *Sc. dysgalactiae* von 9,3 % der infizierten Kühe auf 2,3 % senken. Nach PHILPOT (1975) ist das Reservoir für *Sc. dysgalactiae* in Tonsillen und Hautläsionen zu suchen. Durch das Maul der Kuh bzw. des Rindes sind somit neue Infektionen möglich, wie es bei den Ansaugmastitiden zum Ausdruck kommt. Auf gesunder Zit-

zenhaut konnte *Sc.dysgalactiae* ebenfalls isoliert werden, auch wenn das Euter von diesen Erregern frei war. Unter Umständen kann der *Sc.dysgalactiae* monatelang in der Milch nachgewiesen werden, ohne aber Krankheitssymptome hervorzurufen. Nach SEELEMANN (1954) war der Keim häufig im Zusammenhang mit Maul- und Klauenseucheinfektionen zu finden. Dieser Autor konnte auch bei Organuntersuchungen im Rahmen der Fleischschau *Sc.dysgalactiae*, z.B. bei Sepsisfällen und Pneumonien, isolieren. Dieses Ergebnis wird von WEISER (1979) bestätigt, und zwar schreibt er dem *Sc.dysgalactiae* eine entscheidende Rolle als Infektionserreger beim erwachsenen Rind zu. In seinen Untersuchungen an Organen not- und krankgeschlachteter Rinder und Kälber im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung waren fast die Hälfte der beim erwachsenen Rind isolierten Streptokokkenarten pathogen, davon in 94 % der Fälle solche, die als Mastitiserreger gelten. In der Häufigkeit steht *Sc.dysgalactiae* an erster Stelle, gefolgt von *Sc.uberis*, den Streptokokken der serologischen Gruppen P,L und den B-Streptokokken. 25 % gehörten zur serologischen Gruppe D, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, da sie mehr im lebensmittelhygienischen Bereich von Bedeutung ist, und 20 % zu Gruppe N. Die restlichen waren serologisch nicht eingruppierbar. Der Autor vermutet epidemiologische Wechselbeziehungen zwischen Mensch und Tier und spricht vom Geflügel und Schwein als weiterem Keimreservoir für das Rind. Bei Kälbern waren dagegen Streptokokkenisolierungen selten und Zusammenhänge zwischen Erreger und sichtbarem Krankheitsprozeß nur in einzelnen Fällen erkennbar.

*Sc.uberis* bezeichnen BRAMLEY, SHEARN und KINGWILL (1978) als bedeutsame Ursache für das Auftreten von Mastitis in der Herde und für Infektionen trockenstehender Euter. KINGWILL (1973) konnte in drei Jahren die Infektionsrate von 11,5 % der Kühe auf 6,8 % senken. Nach PHILPOT (1975) treten Infektionen mit *Sc.uberis* besonders vor dem ersten Kalben und in der Trockenstellperiode auf. Er fordert deshalb mehr Hygiene. BRAMLEY, KINGWILL und SHEARN (1978) meinen, daß *Sc.uberis* durch Melkhygiene allein kaum unter Kontrolle zu bringen ist, da die

Stroheinstreu große Mengen dieser Keime beherbergen kann, was für bestimmte Ausbrüche von *Sc.uberis*-Mastitiden von Bedeutung sein kann. KINGWILL (1973) sieht als Reservoir die Euterhaut, wo die Erreger lange überdauern können. Rektal entnommene Proben enthielten nur wenige *Sc.uberis*-Keime, deshalb hält er diese Kontaminationsmöglichkeit für unwahrscheinlich. Durch die Fähigkeit, Aeskulin zu spalten, ist *Sc.uberis* von den vorgenannten obligaten Mastitiserregern zu unterscheiden (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970).

Die Streptokokken der serologischen Gruppe C haben trotz unterschiedlichen Aussehens und Auftretens alle ein gemeinsames Gruppenantigen. SEELEMANN (1954) konnte den in diese Gruppe gehörenden *Sc.equisimilis* wiederholt aus Kuhmilch isolieren, ohne daß dieser eine Mastitis verursacht hatte. Der Erreger kann gelegentlich vom Menschen auf das Euter übertragen werden und möglicherweise zu Milchepidemien Anlaß geben. Das ist das milchhygienische Problem dieser Spezies, dem aber nicht allzu große Bedeutung geschenkt werden muß. Eine gewisse Bedeutung hat die serologische Bestimmung, da eine Antigenähnlichkeit mit einigen Varietäten der A-Streptokokken besteht (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970). Diese Autoren halten aber den *Sc.equisimilis* im allgemeinen beim Tier für unbedeutend. Als weiterer zur Gruppe C gehörender Streptococcus soll noch der *Sc.zooepidemicus* erwähnt werden, der relativ selten an der Entstehung von Mastitiden beteiligt ist. Beim Menschen kann er oberflächliche Wundinfektionen verursachen, allerdings nur nach massivem direktem Kontakt mit dem Erreger, da der Mensch nicht so empfänglich zu sein scheint. Zur Abgrenzung von A-Streptokokken ist eine genaue Differentialdiagnostik erforderlich (SEELEMANN, 1954).

Die serologische Gruppe A stellt die für den Menschen bedeutendsten haemolytischen Streptokokken (SEELEMANN, 1954). Beim Rind haben sie eine weitaus geringere Bedeutung. Von mit *Sc.pyogenes humanus* A infizierten Menschen können eine Kontamination der Milch, aber auch Infektionen des Euters erfolgen. Der Genuß nicht pasteurisierter Milch kann beim Menschen Epi-

demien auslösen (SEELEMAN, 1954). Durch A-Streptokokken können akute Mastitiden hervorgerufen werden. Über die Milch der betreffenden Tiere kann dann ebenfalls eine Infektion des Menschen stattfinden, wobei der infizierte Mensch nun erneut als Überträger für das Tier oder weitere Menschen in Betracht kommt.

Die Streptokokken der serologischen Gruppe L können auch beim Rind zu purulenten Mastitiden führen, ebenso die haemolytischen Streptokokken einiger anderer serologischer Gruppen (z.B. G, O, Q), die nur eine untergeordnete Rolle als Mastitiserreger spielen (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970) und deswegen nicht weiter beschrieben werden.

## 2.2 Diagnostik euterpathogener Streptokokken

Im Rahmen bakteriologischer Milchuntersuchungen bildet der Blutagar die Basis für die Isolierung und Identifizierung euterpathogener Mikroorganismen. Neben dem charakteristischen Wachstum und Haemolyseverhalten der Streptokokken bietet die Blutplatte bei Zusatz von Aeskulin ein weiteres wichtiges Differenzierungskriterium. Zur weiteren Unterscheidung können die auf der Blutplatte als Aeskulin nicht spaltende Streptokokken erkannten Kolonien folgenden Tests unterzogen werden: CAMP-Test, Hippurat-Test und Pigmentbildung im Columbia-Agar ermöglichen die Abgrenzung von *Streptococcus agalactiae*, der Bacitracin-Test die Abgrenzung von Streptokokken der serologischen Gruppe A, und schließlich ist die serologische Differenzierung der isolierten Mastitisstreptokokken möglich. Zur Vermeidung der meist vorhandenen Begleitkeime werden Selektivmedien empfohlen.

EDWARDS (1940) beschreibt zur Anreicherung von Streptokokken den Kristallviolett-Aeskulin-Blutagar und die Kristallviolett-Natriumazid-Bouillon. Natriumazid zeigte sich dabei ebenso wie Thalliumsalze sehr wirksam zur Hemmung gramnegativer Mikroorganismen. Heute werden diese beiden Nährmedien in modifizierter Form und in den einzelnen Rezepturen geringgradig abweichenden Mengenangaben als z.B. Edwards-Medium (modifiziert nach

Oxoid) und Streptosel-Broth (BBL) von der Industrie als festes bzw. flüssiges Anreicherungsmedium angeboten. Dem modifizierten Blutagar wird Thalliumsulfat (nach McKENZIE, Oxoid) zur Hemmung der gramnegativen und Kristallviolett zur Hemmung der grampositiven Begleitflora zugegeben (TK-Medium). Zur Abgrenzung von Aeskulinspaltern wird Aeskulin in 0,1 % Konzentration zugefügt. Um die B-Streptokokken  $\beta$ -haemolytisch wachsen zu lassen, erwies sich die Zugabe von Staphylokokken- $\beta$ -Toxin (entsprechend dem CAMP-Phänomen) als optimal (TKT-Medium). SKALKA, SMOLA und PILLICH (1979) haben durch den Gebrauch einer haemolytisch aktiven "Exosubstanz" von *Corynebacterium pseudotuberculosis*, die sie als COREX bezeichnen und als Zusatz zu Blutplatten verwenden, die von den Streptokokken der serologischen Gruppe B verursachte Haemolyse verstärkt. Ähnlich wie im CAMP-Test das Staphylokokken- $\beta$ -Toxin potenziert COREX die Haemolyse der Streptokokken der serologischen Gruppe B. Im Gegensatz zu Staphylokokken- $\beta$ -Toxin verstärkt die "Exosubstanz" die haemolytische Aktivität der *Sc.uberis*-Stämme nicht, womit die im CAMP-Test positiven *Sc.uberis*-Stämme ausgeschlossen werden können. Sie ist für die schnelle Diagnostik von *Sc.agalactiae* vor allem im Hinblick auf seine Unterscheidung von *Sc.uberis* geeignet. COREX besitzt diese Fähigkeit in nativer und vorgereinigter Form und ist auch als Zusatz zu Nährböden verwendbar.

Im folgenden soll besonders auf die Streptokokkendifferenzierung, soweit sie zur Absicherung der Diagnose *Sc.agalactiae* führt, eingegangen werden.

### 2.2.1 Morphologie

Im Primärausstrich wird oft die für Galtstreptokokken typische Bildung langer Ketten vergeblich gesucht. Die Streptokokken liegen häufig einzeln oder zu zweien nebeneinander, so daß ihre Abgrenzung mikroskopisch oft von anderen Kokken nicht möglich ist. Die Größe der einzelnen Kokken liegt bei etwa 1  $\mu$ . Ihre Form ist rund bis oval.

Auf Blutagar erscheinen die Streptokokken als kleine farblos opaleszente Kolonien von 0,5 bis etwa 1 mm Durchmesser mit meist glattem, manchmal unregelmäßigen Rand (HALLMANN und BURKHARDT, 1974). In Bouillon erfolgt das Wachstum in kurzen, mittellangen und langen Ketten entweder unter gleichmäßiger Trübung der Bouillon oder unter Bildung eines schleimig flockigen Bodensatzes (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970). Im Kulturpräparat zeigen sie gute Färbbarkeit und sind in Diploform in kürzeren oder längeren Ketten gelagert (HALLMANN und BURKHARDT, 1974).

Nach SEELEMANN (1954) können Variationen der Wachstumseigenschaften bei ein und demselben Stamm im Laufe weiterer Anzüchtungen vorkommen.

## 2.2.2 Haemolyseformen

Nach SEELEMANN (1954) sind die haemolysierenden Eigenschaften wesentlich bei der Charakterisierung der Streptokokken. Es wird unterschieden zwischen  $\alpha$ -,  $\alpha'$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Haemolyse. Bei der  $\alpha$ -Haemolyse bildet sich direkt um die Kolonie eine grau-grünlich verfärbte Zone (zerstörte Erythrozyten), an die sich eine deutlich aufgehellte Zone als "Ring" anschließt (Erythrozyten mehr oder weniger zerstört) und die wiederum von einer schwach aufgehellten Übergangszone (nur noch wenig zerstörte Erythrozyten) umgeben wird. Dem folgt der unveränderte Blutagar. Dies trifft für die serologischen Gruppen D, H, N, K, O, zum Teil auch für C und die Viridansgruppe zu. Eine genaue Aussage über diese Haemolyseform ist nur nach mikroskopischer Untersuchung möglich.

Die  $\alpha'$ -Haemolyse ist oft schon nach weniger als 24 Stunden Bebrütungsdauer mit einer helleren breiteren Ringzone unmittelbar um die Kolonien sichtbar, ohne die grau-grünlich verfärbte Zone teilweise zerstörter Erythrozyten. Sie nimmt eine Zwischenstellung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Haemolyse ein (z.B. Gruppe B).

Bei der  $\beta$ -Haemolyse bildet sich um die Kolonie eine breite haemolytische Zone, daran schließt sich eine Übergangszone

mit abgeschwächter Haemolyse an, bevor der unveränderte Blutagar folgt (Gruppe A, C, G, L, M, P. und z.T. E). Die  $\gamma$ -Haemolyse bewirkt keine sichtbare Veränderung des Blutagars, gelegentlich kann eine mehr oder weniger deutliche Aufhellung auftreten.

### 2.2.3 Aeskulinspaltung

Zu einer Vordifferenzierung der Streptokokken auf Blutagar oder Selektivnährböden wird das Verhalten gegenüber Aeskulin geprüft, einem Glykosid aus der Rinde der Roßkastanie, das im filtrierte UV-Licht blaue Fluoreszenz zeigt. Dieser Stoff wird durch Streptokokken der serologischen Gruppen D, E, N, P, Q, R, S, T, U und einigen nicht serologisch eingruppierbaren Streptokokken hydrolytisch in Traubenzucker und Aeskuletin gespalten. Angehörige einiger Gruppen (G, H, L) zeigen positive oder negative Reaktionen. Bei positiver Reaktion (Spaltung) tritt statt der blauen Fluoreszenz bräunlich-schwarze Färbung auf (DIERNHOFER, 1932). Um die Spaltung des Aeskulins noch deutlicher zu machen, kann 1 ml 7% Eisenchloridlösung oder 1 % Ferrizitratlösung der Aeskulin-Bouillon zugefügt werden, wobei sich bei Aeskulin-positiven Streptokokken ein grün-schwarzer Niederschlag bildet.

### 2.2.4 CAMP-Test

Der CAMP-Test (CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN, 1944) wird in der Bundesrepublik Deutschland vorrangig zur Differenzierung von *Sc. agalactiae* eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden auf einer Schaf- oder Rinderblutagarplatte ein  $\beta$ -haemolytischer *Staphylococcus aureus*-Stamm diametral ausgestrichen und senkrecht dazu der zu untersuchende Streptokokken-Stamm aufgetragen. Im Kontaktbereich der beiden Stämme bildet sich bei einem Streptokokken-Stamm der serologischen Gruppe B eine trichter- bis schalenförmige Haemolysezone. "Falsch-positive" Ergebnisse können bei Streptokokken der Gruppe A, C, E und G auftreten (BISPING, 1973; REMMERS, 1975). Da 14,9 % der *Sc. uberis*-Stämme einen positiven CAMP-Test zeigen (SCHALM et al., 1971), wird der Zu-

satz von Aeskulin empfohlen. Ebenso sollen 3,1 % der *Scagalactiae*-Stämme ein negatives CAMP-Ergebnis liefern (SCHALM et al., 1971). Die Sicherheit des CAMP-Testes wird mit 96 - 98% (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970) angegeben. WIESNER (1974) spricht dagegen von nur ca. 80 % Sicherheit. BEERWERTH (1965) wertet den CAMP-Test jedoch als ausreichend sicher, da die Mehrzahl der euterpathogenen Streptokokken durch die Gruppe B im Gegensatz zu den anderen CAMP-positiv reagierenden serologischen Gruppen gestellt wird, jedoch in forensisch wichtigen Fällen hält er eine serologische Untersuchung für unerlässlich.

WILKINSON (1977) beschreibt einen CAMP-Disk-Test, wobei Papier-Blättchen mit teilweise gereinigtem  $\beta$ -Haemolysin einer Staphylokokkenkultur imprägniert sind und sich nach Aufbringen dieser Blättchen auf eine Blutplatte mit B-Streptokokken an der Berührungsstelle Blättchen - Impfstrich eine Haemolysezone bildet. FUCHS, CHRISTY und JONES (1978) stellen einen "Vielfach"-CAMP-Test vor. Hierbei werden auf einer Schafblutplatte in Vertiefungen, die in Reihen angeordnet sind, 4-6 Stunden in Streptosel-Broth bebrütete Streptokokken eingefüllt. Ein  $\beta$ -haemolytischer Staphylokokken-Stamm wird parallel zu den Reihen verimpft und die Platte bei 35°C über Nacht bebrütet. Auf einer Platte können so bis zu 32 Stämme gleichzeitig untersucht werden. MEYER, HESS und BEISSNER (1978) entwickelten für den CAMP-Test eine Toxinplatte. Sie verwenden eine Kälberblutagarplatte mit Zusatz von Toxin aus  $\beta$ -haemolisierenden Staphylokokken, Kongorot und Aeskulin. Das Kälberblut wird vorher auf seine Tauglichkeit geprüft. Aeskulin wird zum Ausschluß anderer Streptokokken-Stämme zugefügt. Durch die Zugabe von Kongorot im Verhältnis 1 : 20 000 wird die Haemolyse unterdrückt (BECHT, 1961), nicht jedoch das CAMP-Phänomen; so erscheint eine Betahaemolyse nur als leichte Aufhellung unter dem Rasen, und man kann sie von der CAMP-Haemolyse eindeutig unterscheiden. Bei CAMP-negativen Stämmen versagt die Toxinplatte, jedoch konnten die oben genannten Autoren solche Stämme nur in weniger als 1 % aller isolierten B-Streptokokken im Untersuchungsmaterial feststellen.

### 2.2.5 Hippurat-Test

Bevor die serologische Eingruppierung nach LANCEFIELD (1933) bekannt war, wurde von AYERS und RUPP (1922) auf die Eigenschaft der Galtstreptokokken hingewiesen, Hippursäure in Benzoesäure und Glykokoll hydrolytisch spalten zu können. Die Spaltung des Natriumhippurates läßt sich einerseits durch den Nachweis der Benzoesäure mit 7 bzw. 12 % Eisenchloridlösung (AYERS und RUPP, 1922; KLIMMER und SCHÖNBERG, 1951; FERRIERI, WANNAMAKER und NELSON, 1972; FAKLEM et al., 1974) darstellen, wobei Eisenbenzoat entsteht, das einen bräunlichen, unlöslichen Niederschlag bildet, wenn 1/5 oder mehr des Natriumhippurates gespalten worden ist ((AYERS und RUPP, 1922; FERRIERI, WANNAMAKER und NELSON, 1972). Andererseits kann der Nachweis des Glykokolls mit Ninhydrin erbracht werden, wobei Stämme, die Natriumhippurat spalten, mit dem Ninhydrin-Reagenz eine tief purpurrote Farbe produzieren (HWANG und EDERER, 1974). Für das flüssige Nährmedium werden verschiedene Rezepturen beschrieben (AYERS und RUPP, 1922; KLIMMER und SCHÖNBERG, 1951; FAKLEM et al., 1974). Es wird aber stets 1% Natrium-Hippurat zugesetzt. Die erstgenannte Methode (Nachweis der Benzoesäure) erfordert 48 Stunden Bebrütungszeit, die zweite (Nachweis des Glykokolls) nur zwei Stunden, wobei jedoch erheblich mehr Ausgangsmaterial benötigt wird. EDBERG und SAMUELS (1975) versuchten, die Vorteile der o.g. Methoden (wenig Material, kurze Bebrütungsdauer) mit einem colorimetrischen Test zu vereinen. Dieser Test benötigt ein sogenanntes Hauptreagenz (Rhodamin B), das unter UV-Licht eine fluoreszierende Verbindung mit der Benzoesäure eingeht, und ein Hilfsreagenz (Uraniumacetat), das diese Verbindung in sichtbarem Licht deutlich macht. Beide Methoden zeigten 100 % Übereinstimmung mit der Eisenchlorid-Methode (AYERS und RUPP, 1922) und 96 % Übereinstimmung mit der serologischen Eingruppierung nach LANCEFIELD (1933) und dem 24 Stunden dauernden CAMP-Test (CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN, 1944).

Kombinationen von Natriumhippurat-Brühe und Aeskulin sind von DAVIS und ROGERS (1939) und von VAN DER SCHEER (1941) beschrieben.

ben worden, um den Untersuchungsgang zu vereinfachen. SEELEMANN (1954) bestätigt die dabei erzielten Ergebnisse, doch findet er, daß die Reaktionen bei den Aeskulin-negativen Streptokokken deutlicher abzulesen sind als bei den Aeskulin-positiven, was anfänglich sicher zu Unsicherheiten in der Diagnostik führen kann.

#### 2.2.6 Bacitracinempfindlichkeit

Bacitracin, eine Mischung aus mindestens 10 verschiedenen Polypeptiden, wurde von JOHNSON, ANKER und MELENEY (1945) aus *Bacillus subtilis*-Kulturen isoliert. Es wird heute als lokal sehr wirksames Antibiotikum in Kombinationspräparaten verwendet. Die Wirkung des Bacitracins beruht auf der bakteriziden Eigenschaft einiger seiner Polypeptide, die eine erhöhte Effektivität gegenüber Streptokokken der serologischen Gruppe A besitzen (NEWTON und ABRAHAM, 1950). So zeigen  $\beta$ -haemolytische Streptokokken der serologischen Gruppe A eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin (MAXTED, 1953; EDERER et al., 1971; POLLOCK und DAHLGREN, 1974). MAXTED (1953) empfiehlt jedoch nur  $\beta$ -haemolytische Stämme zu testen, da auch Stämme mit  $\alpha$ -Haemolyse, die sonst aber nicht eingruppierbar sind, gehemmt werden. A-Streptokokken lassen sich mit ungefähr 80 % Sicherheit schneller und mit weniger Aufwand und Material feststellen als bei einer serologischen Untersuchung. Da nur 1,7 % von 2.386 Stämmen, die Bacitracin-empfindlich waren, nicht zur serologischen Gruppe A gehörten und 2,5 % von 851 resistenten Stämmen A-Streptokokken waren, kann dieser geringe Prozentsatz an "falsch-positiven" bzw. "falsch-negativen" Ergebnissen gegenüber der erzielten Material- und Zeitersparnis in Kauf genommen werden (MAXTED, 1953). Er weist aber auch auf eine mögliche Resistenz in Abhängigkeit von der therapeutischen Anwendung des Bacitracins hin. EDERER et al. (1972) meinen, daß die B-Streptokokken einen größeren Prozentsatz an "falsch-positiven" Ergebnissen liefern als die C-Streptokokken, und möchten deshalb nicht auf die serologische Untersuchung verzichten. Sie rechnen mit einem Gesamtirrtum von 8,5 % ("falsch-

positive" und "falsch-negative" Ergebnisse), wobei 4,1 % der A-Streptokokken gegenüber Bacitracin resistent waren, und sie der serologischen Gruppe G die größte Fehlerquote zuschreiben. POLLOCK und DAHLGREN (1974) behaupten, daß im oberen Respirationstrakt (Gruppe A mit 51,7 %, Gruppe C mit 20,4 %) und in Wunden (Gruppe A mit 79,1 %) vorherrschende Gruppen die höchste Rate an "falsch-positiven" Ergebnissen, dagegen die im Genitaltrakt vorherrschende serologische Gruppe B (mit 71,2 %) die geringste Rate an "falsch-positiven" Ergebnissen liefert. 0,5 % der A-Streptokokken zeigten Resistenz gegenüber Bacitracin, 2,6 % der B-Streptokokken, 6,0 % der C-Streptokokken, 8,0 % der G-Streptokokken und 2,2 % der serologisch nicht eingruppierbaren Stämme waren Bacitracin-empfindlich. HAHN, HEESCHEN und TOLLE (1970) sprechen in Übereinstimmung mit den anderen Autoren von einer Sicherheit, die zwischen 80 und 90 % liegt, und sie werten die Bacitracinempfindlichkeit als zuverlässiges Suchkriterium.

#### 2.2.7 Pigmentbildung

Haemolytische B-Streptokokken bilden unter bestimmten Voraussetzungen (Zusammensetzung des Agars, pH-Wert und Milieu) orange bis rotes Pigment. Dieses Phänomen wurde schon von ORLA JENSEN (1919) und von DURAND und GIRAUD (1923) in Casein-Pep-ton-Agar nach Zugabe von Stärke im anaeroben Milieu beschrieben. FALLON (1974) stellte fest, daß haemolytische Streptokokken-Stämme in  $H_2$  und  $CO_2$ -Atmosphäre auf Columbia-Agar-Platten (Oxid; pH 7,3 und darüber) die besten orange bis braunen Färbungen zeigten. Da er bei Zugabe von Stärke auch auf Nutrient-Agar Pigmentbildung erhielt, sieht er im Stärkegehalt eine wichtige Komponente für die Farbbildung, was jedoch von MERRITT und JAKOBS (1976) bestritten wird. Bei der Erprobung eines neuen Grundmediums konnte ohne Zugabe von Stärke ein völlig rotes Pigment festgestellt werden, dagegen war das Wachstum der Streptokokken deutlich geringer, und die Pigmentproduktion nicht gleichmäßig im gesamten Stichagar vorhanden. Nicht haemolytische Stämme produzieren kein Pigment (FALLON,

1974). Nach LANCEFIELD (1934) ist aber ein Stamm, der seine haemolytischen Eigenschaften und die Fähigkeit Pigment zu produzieren ebenfalls verliert, nicht weniger virulent. Somit werden virulente, aber nicht haemolytische B-Streptokokken nicht erfaßt. FALLON (1974) konnte mit seiner Methode 85 % der B-Streptokokken erkennen. "Falsch-positive" Ergebnisse traten nicht auf. MERRITT, TREADWELL und JAKOBS (1976) vereinfachten die Versuchsmethode wesentlich, indem sie die Pigmentbildung in Stichagar im aeroben Milieu beobachteten. Das Anlegen einer Stichkultur in Columbia-Agar ohne Zusätze und 24-stündiges Bebrüten bei 37°C ohne besondere Agar- und Milieuvorbereitung ist ein schneller Test, sogar besser zu handhaben als der Hippurats-Test, und vermeidet den erheblichen Aufwand, der für das Herstellen eines anaeroben Milieus erforderlich ist. Auch hier gab es keine "falsch-positiven" Ergebnisse, d.h. keine andere serologische Gruppe produzierte Pigment. "Falsch-negative" Ergebnisse traten nur bei 3 % der Stämme auf, während FALLON (1974) 15 % angibt. Stichagarkulturen sind Plattenkulturen, auch den unter anaeroben Bedingungen bebrüteten, überlegen, da ein höherer Prozentsatz der B-Streptokokken Farbstoff bildet. MERRITT und JAKOBS (1976) beschreiben ein Medium (GC-Basal-Medium; Difco), das von weißer Farbe und in der Zusammensetzung ähnlich dem Columbia-Agar ist. In diesem von den Autoren als DMS-Medium bezeichneten Nährboden war erst nach Zugabe von Proteose-Pepton eine Pigmentbildung erreicht worden. Die Autoren meinen, daß in einem weißen Grundmedium auch von weniger geübten Untersuchern bei nur schwach Pigment produzierenden Stämmen eine Farbbildung besser erkannt werden kann. Auch bei diesen Untersuchungen traten keine "falsch-positiven" Ergebnisse auf. Die Zahl "falsch-negativ" reagierender B-Streptokokken konnte durch das DMS-Medium gesenkt werden.

#### 2.2.8 Serologische Differenzierung

Grundlage der serologischen Differenzierung ist das gruppenspezifische C-Polysaccharid-Antigen, ein vielverzweigtes Polysaccharid mit etwa zehn Seitenketten, mit den gruppenspezi-

fischen determinanten Endgruppen. Die Endgruppe besteht z.B. bei Streptokokken der serologischen Gruppe A aus N-acetylglucosamin, bei Gruppe B aus L-Rhamnose, bei Gruppe C aus N-acetylgalactosamin. Die Gruppenantigene sind in der Zellwand unter den Proteinantigenen gelegen und mit dem Mucopeptid durch Phosphatbrücken verbunden. Bei den serologischen Gruppen D und N vermutet man das Antigen auf der Plasmamembran. Fast jede Gruppe umfaßt verschiedene Typen-Antigene, die aus Protein- oder Kohlenhydrat-Verbindungen bestehen (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970; EL KHOLY, WANNAMAKER und KRAUSE, 1974).

Das gruppenspezifische C-Polysaccharid-Antigen verursacht nach Immunisierung von Kaninchen die Bildung spezifischer Antikörper (SEELEMANN, 1954; HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970). Mit Hilfe dieser Antikörper lassen sich dann Streptokokken-Stämme anhand des gruppenspezifischen Polysaccharid-Antigens differenzieren. Zur Gewinnung dieses Antigens werden die fraglichen Streptokokkenkulturen in flüssigen Selektivmedien (z.B. Streptococcal Broth von BBL), bei Reinkulturen aber auch Standard-I-Nährbouillon (Merck), angereichert. Dann erfolgt nach Zentrifugation die Extraktion des gruppenspezifischen C-Polysaccharides aus dem Sediment nach verschiedenen Verfahren, die nachstehend beschrieben werden.

#### Antigengewinnung

Das ursprüngliche Verfahren ist die Salzsäureextraktion nach LANCEFIELD (1933), wobei mit 0,05 n HCl bei pH 2 und 100°C das serologisch aktive Polysaccharid nur zum Teil in Lösung geht. Bei der Extraktion nach FULLER (1938) mit Formamid bei 150°C bis 180°C im Ölbad und in verschiedenen Arbeitsgängen lassen sich 95 % der serologisch aktiven Verbindungen lösen. SEELEMANN (1954) gibt der Extraktion nach FULLER (1938) den Vorzug, da die Antigene der Extraktion nach LANCEFIELD (1933) oft unspezifische und undeutliche Reaktionen liefern, besonders bei Seren geringerer Qualität.

EL KHOLY, WANNAMAKER und KRAUSE (1974) führten eine Säureextraktion durch. Diese sieht eine Verminderung der Anreiche-

rungsflüssigkeit auf 5 ml vor. Die Extraktion wird mit einem Tropfen Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ), zwei Tropfen Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) und einem Tropfen Eisessig durchgeführt. Die Autoren überprüften die Extraktherstellung zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 15, 30 und 60 Minuten) und bei verschiedenen Temperaturen ( $4^\circ\text{C}$ ,  $22^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$ ). Die besten Ergebnisse erzielten sie bei Raumtemperatur ( $22^\circ\text{C}$ ) und 15 Minuten Extraktionsdauer. Eine 24 Std. dauernde Extraktion wies weniger aktives Antigen auf, was auf einen Zerfall des Kohlenhydrates hinweisen könnte. Dies wurde auch von HRYNIEWICZ et al. (1976) nach Extraktion mit salpetriger Säure beobachtet. Die genannten Autoren beurteilen die Extraktherstellung nach EL KHOLY, WANNAMAKER und KRAUSE (1974) als einfach und schnell und auch die Empfindlichkeit zufriedenstellend, jedoch soll die Ergiebigkeit bedeutend geringer sein als bei der Methode nach LANCEFIELD (1925).

MAXTED (1948) beschrieb eine enzymatische Extraktion, wobei mit einem aus *Streptomyces albus* isolierten Enzym die Streptokokkenzellen bzw. Zellwände lysiert und das Antigen freigesetzt werden. Das Filtrat dieses Extraktes enthält das Antigen.

EDERER et al. (1972) stellen ein Enzym aus *Streptomyces griseus* (Pronase B) vor, mit dem sie ebenfalls eine Extraktion der Gruppen A-N durchführten und 100 % Übereinstimmung mit der Methode nach LANCEFIELD (1933) erzielten. Auch die Antigene der Gruppen D und K waren gegenüber der Methode von MAXTED (1948) extrahierbar. Die Pronase wird in einem Boratpuffer mit pH 7,4 - 7,5 zu 20 mg pro ml gelöst und kann so im Kühlschrank oder eingefroren aufbewahrt werden. Zur Extraktion wird die Pronaselösung dem Sediment einer 24 Std. bei  $37^\circ\text{C}$  in Nährbouillon bebrüteten Streptokokkenkultur zugegeben. Die Extraktion erfolgt 2 - 4 Std. lang im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  -  $45^\circ\text{C}$ . Nach Zentrifugation kann der Überstand als Antigen für die weitere Untersuchung verwendet werden. pH-Wert und Temperatur müssen jedoch streng eingehalten werden. REMMERS (1975) vergleicht die im Handel erhältlichen Produkte Pronase B (Calbiochem) und Pronase E (Merck), ohne Unterschiede

in der Wirkung festzustellen. Die Verwendung der Pronase E ermöglicht allerdings eine deutliche Kostenersparnis im Vergleich mit Pronase B. Beide Verfahren stimmen mit der Formamid-Extraktion nach FULLER (1938) überein, die Zahl der Arbeitsgänge ist jedoch von 8 auf 3 verringert.

Ferner ist eine Extraktion mit Phagenlysin von Streptokokken der Gruppe C zu erwähnen, wobei Zellen und Zellwände völlig gelöst werden können, die Kohlenhydrate jedoch mit Mucopeptidanteilen verunreinigt sind (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970).

Eine Extraktion durch Autoklavieren der Zellsuspension (Sediment der Streptokokkenkulturen mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und 15 Minuten bei 120°C und 1,3 bis 1,4 atü autoklaviert) beschreiben RANTZ und RANDALL (1955). Das C-Polysaccharid wird gelöst, ist aber mit Proteinantigenen verunreinigt. Eine weitere Reinigung kann durch Acetonausfällung erfolgen. Mit der Formamid-Extraktion besteht Übereinstimmung. Auch die Gewinnung von Antigen durch Ultraschall-Desintegration der Zellen, anschließender Säurehydrolyse und Pepsinverdauung ist möglich. Die Extrakte neigen jedoch mehr zu Kreuzreaktionen (z.B. Gruppe A und A-Variant) als bei den anderen Methoden (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970).

### Röhrchenpräzipitation

Nach der Antigen- bzw. Extrakterstellung erfolgt die Präzipitation. SEELEMANN (1954) empfiehlt die Röhrchenpräzipitation. Hierzu werden 4 cm lange Röhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm mit Serum gefüllt und mit der gleichen Menge Streptokokkenextrakt überschichtet. An der Berührungsstelle entsteht bei homologem Serum und Antigen eine Präzipitationsbande. Diese Reaktion ist nach etwa einer Minute sichtbar, manchmal auch später, besonders bei schwachen Seren. Zuerst wird dieser "Präzipitationsring" noch etwas breiter, später tritt jedoch eine Vermischung ein. Bei negativer Reaktion bleibt die Grenze zwischen Serum und Antigen klar.

Um den Serumverbrauch so gering wie möglich zu halten, wird

die Kapillarmethode verwendet. In selbst hergestellte Kapillarröhrchen mit einem Durchmesser von  $1/4$  bis  $1/2$  mm wird mit Hilfe einer noch dünneren Kapillarpipette das Serum gebracht und mit Extrakt überschichtet. Auch hier zeigt sich nach einigen Minuten bei positiver Reaktion ein Präzipitationsring. Mit der Herstellung der nur einmal brauchbaren Kapillaren ist ein entsprechender Arbeitsaufwand verbunden, während die Röhrchen nach Reinigung und Trocknen wieder verwendet werden können. SEELEMANN (1954) findet auch den Serumverbrauch bei der Röhrchenpräzipitation nicht zu hoch. Für ihn ist sie die Methode der Wahl, schnell und sehr gut ablesbar. Es sei noch erwähnt, daß SEELEMANN (1954) diese Präzipitationsreaktion ähnlich der Agglutination auch auf dem Objektträger durchführte. Bei positivem Ausfall zeigte sich eine Trübung des Extraktgemisches. Das Ergebnis war jedoch nicht immer so deutlich erkennbar wie bei der Röhrchenmethode.

#### Agar-Gel-Präzipitation auf dem Objektträger

OUCHTERLONY (1949) führte die Agar-Gel-Präzipitation (AGP) als Plattentest durch. Mittlerweile wird sie in modifizierter Form als Objektträgertest mit geringem Materialverbrauch und schnellerem Reaktionsablauf durchgeführt (KUNTER, 1962). Dieser Autor verwendet 2%igen Agar, wobei die Konzentration je nach Qualität verändert werden kann. Die Schichthöhe des Agars auf dem Objektträger beträgt 1,6 mm, der Durchmesser der Löcher 7 mm. Um ein zentrales Loch werden bis zu 6 Löcher aus dem Agar gestanzt. Die langsamer diffundierenden Antiseren werden 30 Minuten vor den Extrakten eingefüllt. Der mit Antiseren und Extrakt beschickte Objektträger wird dann in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. KUNTER (1962) prüfte die Anwendung des AGP bei der Streptokokken-Differenzierung und stellte Vorteile gegenüber der Röhrchenpräzipitation für die Routine-Diagnostik fest. Der Antiserumverbrauch ist geringer, mit 0,05 - 0,1 ml lassen sich 4 - 5 Reaktionen durchführen. Getrübte oder haemolytische Seren beeinflussen den Ablauf der Präzipitation nicht, schwächere oder unspezifische Reaktionen lassen sich besser erkennen bzw. ausschließen. Präzipitationslinien er-

scheinen je nach der Wertigkeit der Antiseren bereits nach 30 Minuten und sind im allgemeinen nach 6 Stunden vollständig vorhanden. Nach 24-stündiger Bebrütungsdauer kommt es meist nur noch zu schwachen Reaktionen. Die Qualität der Antiseren ist eine wesentliche Voraussetzung für die Schärfe der Präzipitationslinien. Kreuzreaktionen finden nicht statt. Es besteht völlige Übereinstimmung mit der Röhrchenpräzipitation. HOFFMANN (1972) bestätigt diese Aussagen bezüglich der Agar-Gel-Präzipitation auch bei Routineuntersuchungen. Hierzu verwendet sie, um mehr Proben auftragen zu können, größere Glasplatten. Der Durchmesser der Löcher im Agar-Gel ist etwas verringert (zentrales Loch 5 mm, periphere 2 mm). Nach ihren Untersuchungen, in denen der CAMP-Test bei ungefähr 3 % der Streptokokken negativ war, empfiehlt sie die Agar-Gel-Diffusion als serologisches Verfahren. Nach MEYER (1978) läßt der Agar-Gel-Diffusionstest 5 % mehr B-Streptokokken erkennen als der CAMP-Test.

#### Gegenstromelektrophorese

Dieses international als Counterimmunoelktrophorese (CIE) bezeichnete Verfahren wurde zur Erkennung von *Neisseria meningitidis*, *Diplococcus pneumomiae* und *Haemophilus influenzae* angewendet. DAJANI (1973) beschrieb die Anwendung der CIE bei der Differenzierung von Streptokokken. Das Prinzip der CIE besteht in der Wirkung der Kräfte Endosmose und Stromfluß, die eine gegensätzliche Wanderung von Antigen und Antiserum im elektrischen Feld bewirken (MEYER, 1978). Darin liegt auch die hohe Empfindlichkeit dieser Methode begründet.

Auf einem Objektträger bzw. einer größeren Glasplatte (je nach Anzahl der Proben) wird eine entsprechende Menge 1%ige Agaroselösung (in 0,05 M Barbitalpuffer, pH 8,6 zubereitet) aufgetragen. Nach Erstarren werden parallel verlaufende Lochreihen (Abstand ca. 2 mm, Lochdurchmesser 3 mm) angelegt. Anodenseitig (+) werden jeweils 10 µl Serum eingefüllt, kathodenseitig (-) die zu untersuchenden Antigene. Filterpapierstreifen stellen die Verbindung zwischen Agarose und Pufferkammer (Barbitalpuffer 0,05 M, pH 8,6) her. Die Elektrophorese wird je nach Größe

der Glasplatten mit 3 bis ca. 12 mA 30 Minuten bis 1 Stunde lang in handelsüblichen Apparaten für die Immunelektrophorese durchgeführt (EDWARDS und LARSON, 1973; REMMERS, 1975).

Nach Herstellung der Extrakte (Antigene) durch Säureextraktion konnte DAJANI (1973) von 85 Proben, die Streptokokken der Gruppe A enthielten 69 (81 %) durch die CIE ermitteln. Die übrigen 16 negativ reagierenden Proben zeigten nach der Verimpfung weniger als 50 Kolonien auf der Originalplatte. Bei weiterer Anzüchtung konnten jedoch von den Subkulturen Extrakte hergestellt werden, die dann positiv mit A-Antiserum reagierten. Ferner untersuchte er 31 Proben mit Stämmen der Gruppe B, wobei nur 17 positive Reaktion bei der immunelektrophoretischen Untersuchung aufwiesen. 10 der nicht reagierenden 14 Proben enthielten nach der Verimpfung ebenfalls weniger als 50 Kolonien in der Primärkultur.

Alle Proben mit den Stämmen der Gruppen C und G reagierten positiv. Es traten keine Kreuzreaktionen auf, ebenso keine "falsch-positiven" Reaktionen.

DAJANI (1973) stellt wie später auch RÖTTGER (1977) fest, daß im Gegensatz zu den biochemischen Untersuchungsmethoden die Anwesenheit einer Begleitflora die Spezifität des Testes nicht beeinflußt. Er sieht in der CIE eine objektive, preiswerte, schnelle und sehr spezifische Untersuchungsmöglichkeit.

Zu gleichen Aussagen kommen EDWARDS und LARSON (1973). Auch hier wird die Counterimmunoelktrophorese als empfindlicher reagierend und leichter ablesbar als die Kapillarmethode befunden (nur 76 % der untersuchten Stämme waren in der Kapillarpräzipitation im Gegensatz zur CIE positiv). Die Autoren geben außerdem an, daß die enzymatische Extrakterstellung durch Pronase B für die CIE der Säureextraktion deutlich überlegen ist (4 bis 32 mal wirksamer).

Eine Bewertung der Extrakterstellung unternahmen auch HILL et al. (1974). Sie kamen zu dem Ergebnis, daß zum Nachweis von B-Streptokokken in der CIE keine Extraktion benötigt wird.

In 1 ml Todd-Hewith-Broth verbrachte B-Stämme wurden nach 1, 2, 3 und 4 Stunden Bebrütungsdauer ohne Extraktion in der CIE untersucht. Die 4 Stunden bebrüteten Streptokokken zeigten klare Präzipitationslinien; ohne Inkubation gaben die Bakteriensuspensionen allerdings keine Präzipitate. Da jedoch meist Streptokokken verschiedener Gruppen untersucht werden, ist eine allgemein zufriedenstellende Extraktion zu wählen (z.B. Extraktion mit Pronase B). Die Autoren nehmen nach Filtrationsversuchen an, daß sich eine gewisse Menge an freiem Antigen der B-Streptokokken in dem Nährmedium befindet. MERRITT, TREADWELL und JACOBS (1976) bestätigen das Ergebnis, doch halten sie eine Bebrütungsdauer von 18 - 24 Std. für befriedigender. Auch sie halten die CIE-Methode für empfindlicher als die Kapillarmethode. REMMERS (1975) und RÖTTGER (1977) führten die "Immunoelektrophorese" nach der von EDWARDS und LARSON (1973) beschriebenen Methode durch und empfehlen sie für Routineuntersuchungen. MEYER (1978) konnte durch den Zusatz von Polyäthylenglykol (PEG) 6000 zur Agarose bessere Ergebnisse erzielen. Stämme, die ohne PEG-Zusatz in der CIE und in der Agar-Gel-Diffusion nicht sicher positiv waren, zeigten eindeutige Präzipitationslinien. PEG soll die Hydrathülle der Proteine entfernen und so die Präzipitatbildung erleichtern (MEYER, 1978). Sie stellt ferner fest, daß mit der CIE 50 % mehr Streptokokken in Herdensammelmilchen nachzuweisen sind als bei der Agar-Gel-Diffusion, in Viertelgemelksproben waren es 5 % mehr. Nach WIESNER (1979) können mit Hilfe der Immunelektrophorese auch beim Vorliegen geschädigter und abgestorbener B-Streptokokken deutliche Präzipitate erreicht werden. Er erhielt bei der Untersuchung von 1231 Herdensammelmilchproben in 13,6 % der Fälle eine positive Reaktion mit B-Streptokokken-Antigen. So ergaben Untersuchungen von Herdensammelmilchen in Beständen mit über 30 Kühen bei etwa 20 % eine positive Reaktion mit B-Serum, obwohl der Zellgehalt der Milch unter 250 000/ml lag und B-Streptokokken nicht immer nachgewiesen werden konnten.

### 3. Eigene Untersuchungen

Die eigenen Untersuchungen zielen auf die Frage ab, mit welcher Sicherheit im Routinelabor eines Eutergesundheitsdienstes isolierte Aeskulin-negative euterpathogene Streptokokken, deren Verhalten im Hippurat- (AYERS und RUPP, 1922) und im CAMP-Test (CHRISTIE, ATKINS, MUNCH-PETERSEN, 1944) nicht übereinstimmt bzw. die in beiden Tests negative Reaktionen zeigen, in die serologische Gruppe B nach LANCEFIELD (1933) eingruppiert werden bzw. welchen anderen serologischen Gruppen sie angehören können. Vor allem interessieren hierbei auch die mit Vergrünung auf Rinderblutagar wachsenden Aeskulin-negativen Streptokokken. Die zu prüfenden Streptokokken wurden mit Angabe der im Routinelabor ermittelten Reaktionen (Aeskulinspaltung, CAMP- und Hippurat-Test) vom Eutergesundheitsdienst Traunstein des TGD Bayern e.V. zur Verfügung gestellt. Nach Überprüfung der genannten Reaktionen wurde zusätzlich auf folgende Eigenschaften untersucht: Bacitracinempfindlichkeit, Pigmentbildungsvermögen und serologische Gruppenzugehörigkeit.

#### 3.1 Material

Insgesamt 383 Aeskulin-negative Streptokokken-Stämme wurden untersucht, die aus Galt- bzw. galtverdächtigen Betrieben stammten. Sie wurden aus Viertelgemelksproben bei Routineuntersuchungen des Eutergesundheitsdienstes Traunstein des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V. aufgrund ihres Wachstums auf Aeskulin-haltigem Rinderblutagar isoliert, wobei unterschiedliche Haemolyseformen festzustellen waren. Alle Stämme waren im CAMP- (CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN, 1944) und Hippurat-Test (AYERS und RUPP, 1922) voruntersucht. Anhand der Untersuchungsprotokolle ergaben sich folgende Gruppen (Tabelle 1):

Tabelle 1: Ergebnisse des CAMP- und Hippurat-Tests im Routinelabor bei 383 Aeskulin-negativen Streptokokken

| Anzahl der Stämme | Reaktion im Test |                   |
|-------------------|------------------|-------------------|
|                   | CAMP             | Hippurat-spaltung |
| 3                 | +                | -                 |
| 149               | -                | +                 |
| 231               | -                | -                 |

3 Streptokokkenstämme waren CAMP-positiv und Hippurat-negativ. 149 Stämme reagierten im CAMP-Test negativ, im Hippurat-Test positiv. 231 Stämme zeigten in beiden Tests negative Reaktion.

### 3.2 Methoden

Die auf Blutagar vom Routinelabor übernommenen Streptokokken-Stämme wurden zunächst erneut auf Blutplatten angezüchtet (Tryptose Blood Agar Base mit Zusatz von 7 % gewaschenen Rindererythrozyten und 0,1 % Aeskulin, Difco). Nach Beurteilung der Haemolyseformen (entsprechend SEELEMANN, 1954) wurden mit den Kulturen die Tests durchgeführt, wie sie im einzelnen unter 3.2.1 bis 3.2.5 beschrieben werden. CAMP- und Hippurat-Test wurden bei allen 383 Streptokokken-Stämmen ausgeführt; die Bacitracinempfindlichkeit wurde bei 23 Stämmen mit  $\alpha'$ -Haemolyse und allen  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen geprüft (MAXTED, 1953; EDERER et al., 1972). Bei allen Stämmen mit  $\alpha'$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Haemolyse wurde die Pigmentbildung getestet. Die  $\alpha$ -haemolytischen Stämme wurden entsprechend FALLON (1974) nicht in diese Untersuchung einbezogen. Die serologische Differenzierung erfolgte mit Kaninchen-Antiserum der Gruppen A, B und C (Pasteur). 30 Stämme wurden zur Bestätigung der eigenen Ergebnisse in der Streptokokkenzentrale in Kiel untersucht. Dort wurde auch Antiserum der serologischen Gruppe L einbezogen.

### 3.2.1 CAMP-Test

Der CAMP-Test (CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN, 1944) wurde auf Tryptose-Blood-Agar-Grundsubstrat (Difco) mit Zusatz von 7 % gewaschenen Rindererythrozyten und 0,1 % Aeskulin durchgeführt. Nach diametraler Beimpfung mit einem  $\beta$ -Toxin produzierenden Stamm von Staph.aureus wurden senkrecht dazu die zu untersuchenden Streptokokken-Stämme bis in unmittelbare Nähe des Impfstreiches des Staphylokokkenstammes aufgetragen. Nur eine typische schalen- bis trichterförmige totale Haemolyse im Bereich der Staphylokokken- $\beta$ -Toxin-Zone wurde als positiv bewertet (ZAADHOF und TERPLAN, 1971).

### 3.2.2 Hippuratspaltung

Als Nährbouillon diente Standard-Bouillon (Oxoid), die nach Angaben des Herstellers (13 g auf 1 l) zubereitet wurde. Die mit 1 % Natriumhippurat (Merck) versetzte Nährbouillon wurde in Rundbodengläser zu 5 ml abgefüllt und 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Nach Beimpfung der so vorbereiteten Bouillon mit den zu testenden Streptokokkenstämmen wurde bei 37°C 48 Stunden lang bebrütet. 1 ml des dann meist entstandenen klaren Überstandes, der andernfalls nach Zentrifugation erhalten werden kann, wurde in ein entsprechend kleineres Röhrchen pipettiert, mit 0,5 ml saurer  $\text{FeCl}_3$ -Lösung versetzt und gemischt. Nach 10 bis 15 Minuten Reaktionszeit erfolgte die Auswertung. Ein positives Ergebnis wird mit einem bräunlichen Niederschlag angezeigt, der durch unlösliches Eisenbenzoat gebildet wird (FERRIERI, WANNAMAKER und NELSON, 1972).

### 3.2.3 Bacitracinempfindlichkeit

Die zu prüfende Streptokokken-Kolonie wurde jeweils auf die Hälfte einer Blutplatte übertragen und ausgespatelt (EDERER et al., 1972). Danach wurde mit einer abgeflamten Pinzette ein Bacitracin-Blättchen (Difco) in die Mitte der Hälfte unter vorsichtigem Andrücken aufgelegt. Diese runden Filterpapier-Blättchen mit einem Durchmesser von ca. 9 mm sind hersteller-

seitig mit Bacitracinlösung (3 IE/ml) imprägniert. Nach Bebrüten (24 Stunden bei 37°C) wurde der Durchmesser der wachstumsfreien Zone (Hemmzone) abgelesen. Als deutlich positives Ergebnis galt eine Hemmzone von 15 - 20 mm; 12 - 14 mm wurden als schwach positiv bezeichnet. EDERER et al. (1972) bezeichnen alle Stämme, die eine kleinere Hemmzone als 10 mm aufweisen, als nicht zur serologischen Gruppe A gehörend.

### 3.2.4 Pigmentbildung

Um Pigmentbildung der B-Streptokokken nachzuweisen, wurde Columbia-Agar-Grundsubstrat (Oxoid) verwendet (FALLON, 1974). Dieses Medium besteht aus 2,3 % Spezialpeptongemisch, 0,1 % Stärke, 0,5 % NaCl und 1 % Agar. Das Medium wurde nach den Angaben des Herstellers zubereitet, in Rundbodengläser (ca. 7 ml) gefüllt und 10 Minuten bei 120°C autoklaviert. Die Gläser wurden bis zum Erkalten und Festwerden des Agars schräg gelagert. Mit einer Öse (Durchmesser ca. 1 mm) wurde der zu untersuchende Streptokokkenstamm zunächst als Stichagar verimpft, und zwar vom äußeren Rand zur Mitte zu, um geringere Pigmentbildung gegen den Rand zu besser erkennen zu können (MERRITT, TREADWELL und JAKOBS, 1976). Durch das zusätzliche Beimpfen der schrägen Fläche erhält man gleichzeitig Einzelkolonien. Nach 24-stündiger Bebrütung läßt sich eine leichte bis starke orange bis rote Färbung der Stichzone erkennen. Bei schwacher bzw. undeutlicher Pigmentbildung ist eine Betrachtung vor weißem Hintergrund angezeigt (FALLON, 1974). Das Erkennen einer Pigmentbildung ist bei Tageslicht besser als im fluoreszierenden Licht (MERRITT, TREADWELL und JAKOBS, 1976).

### 3.2.5 Serologische Differenzierung

Die Extraktherstellung des gruppenspezifischen Polysaccharidantigens erfolgte nach der von REMMERS (1975) angegebenen Methode mit Pronase E (Merck). In einem Boratpuffer (EDERER et al., 1972; REMMERS, 1975) wurde 15 mg Pronase E pro ml Puffer gelöst, und die so entstandene Pronase-E-Lösung konnte im Kühl-

schränk oder eingefroren über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank mußte auf mögliche Verunreinigungen geachtet werden.

Die aus Reinkulturen stammenden Streptokokkenkolonien wurden in Standard I-Nährbouillon (Merck), zubereitet nach Angaben des Herstellers (25 g pro Liter), 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach Zentrifugation der bebrüteten Kulturen (3000 U/min.) wurde dem Sediment 0,4 ml Pronase-E-Lösung zugefügt. Im Wasserbad bei 37 - 45°C erfolgte 2-4 Stunden lang die Extraktion des gruppenspezifischen C-Polysaccharid-Antigens. Nach erneuter Zentrifugation (1500 U/min.) wurde der klare Überstand in sterile Samentransportgläschen gefüllt und konnte sofort oder später (auch Einfrieren zur längeren Aufbewahrung möglich) als Antigen verwendet werden.

Der Nachweis der Gruppenantigene wurde in der CIE nach EDWARDS und LARSON (1973) und REMMERS (1975) durchgeführt. 1 % Agaroselösung (Behring, Litex), zubereitet in 0,05 M Veronalpuffer pH 8,6, wurde auf entfettete Objektträger (für 2,5 x 7,5 cm Fläche 3 ml, für größere Glasplatten entsprechend mehr bis zu einer Schichthöhe von 1,5 mm) gleichmäßig aufgebracht. Nach Erstarren wurden parallel verlaufende Lochreihen paarig im Abstand von ca. 2 mm, mit einer Lochgröße von 3 mm angelegt. Je nach Plattengröße kann die Anzahl der Lochreihen variiert und somit die Probenzahl erhöht werden. Die anodenseitigen Löcher wurden mit jeweils 10 µl gruppenspezifischem Antiserum (Kaninchen; Fresenius) beschickt, die kathodenseitigen mit dem zu untersuchenden Streptokokkenextrakt. Mit Filterpapierstreifen (Schleicher & Schüll, Nr. 2668) wurde die Verbindung zwischen Agarose und dem 0,05 M Veronalpuffer pH 8,6 in den beiden Kammern hergestellt. Je nach Größe der Glasplatten (Objektträger 3 mA) wurde die Stromstärke verändert. Die Dauer der Elektrophorese betrug eine Stunde, danach wurden die Platten 30 Minuten stehen gelassen, bevor sie mit Aqua dest. angefeuchteten Filterpapierstreifen bedeckt, auf Glasplatten gelegt und 24 Stunden bei 50°C im Trockenschrank getrocknet wurden. Bei Litex-Agarose mußte die Trockenzeit kürzer gehalten

werden (ca. 4 Std.), da sich der Agarosefilm sonst von der Platte ablöste. Nach dem Trocknen wurden die Präparate angefärbt (Coomassie Brilliant Blue), um die Präzipitationslinien besser sichtbar zu machen.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Haemolyseformen

Die vom Routinelabor übernommenen 383 Streptokokken-Stämme wurden nach ihrem Haemolyseverhalten bestimmt. 198 dieser Stämme zeigten  $\alpha$ -Haemolyse, 71  $\alpha'$ -Haemolyse. 103 Streptokokken-Stämme waren  $\beta$ -haemolytisch und 11 der untersuchten Stämme wuchsen  $\gamma$ -haemolytisch.

#### 3.3.2 CAMP- und Hippurat-Test

Alle 383 Streptokokken-Stämme wurden im CAMP- und Hippurat-Test geprüft.

Insgesamt waren 15 Stämme CAMP-positiv, 368 Stämme reagierten negativ. Hippuratspaltung zeigten 138 Streptokokken-Stämme, 245 waren ohne diese Reaktion. Aufgrund positiver Ergebnisse sowohl vom CAMP- als auch vom Hippurat-Test konnten 11 der geprüften Stämme als *Sc.agalactiae* diagnostiziert werden. 241 Stämme reagierten dagegen in beiden Tests negativ, vier Stämme waren CAMP-positiv und Hippurat-negativ; bei 127 Stämmen wurde ein negatives CAMP-Ergebnis bei Vorhandensein von Hippuratspaltung festgestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse von CAMP- und Hippurat-Test in Beziehung zu den Haemolyseformen der 383 Streptokokken-Stämme

| Haemolyseform | n   | Anzahl der Streptokokken-Stämme mit |         |                  |         |
|---------------|-----|-------------------------------------|---------|------------------|---------|
|               |     | CAMP-Phänomen                       |         | Hippuratspaltung |         |
|               |     | positiv                             | negativ | positiv          | negativ |
| $\alpha$      | 198 | -                                   | 198     | 16               | 182     |
| $\alpha'$     | 71  | 9                                   | 62      | 65               | 6       |
| $\beta$       | 103 | -                                   | 103     | 53               | 50      |
| $\gamma$      | 11  | 6                                   | 5       | 4                | 7       |

Tabelle 2 berücksichtigt neben den Ergebnissen des CAMP- und Hippurat-Tests auch die verschiedenen Haemolyseformen. Die 198 Stämme mit  $\alpha$ -Haemolyse waren alle CAMP-negativ, 16 Stämme zeigten Hippuratspaltung. 9 Streptokokken-Stämme mit  $\alpha'$ -Haemolyse waren CAMP-positiv, 62 CAMP-negativ. 65 dieser Stämme zeigten Hippuratspaltung. Alle 103  $\beta$ -haemolytischen Stämme waren CAMP-negativ, 53 spalteten Hippurat. Von den 11  $\gamma$ -haemolytischen Stämmen waren 6 CAMP-positiv. Nur 4 dieser Stämme waren Hippurat-positiv.

### 3.3.3 Pigmentbildung und Bacitracinempfindlichkeit der $\alpha'$ , $\beta$ - und $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken

Insgesamt wurde von 185  $\alpha'$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen das Pigmentbildungsvermögen im Columbia-Agar getestet. 56 Stämme zeigten eine Farbbildung im Columbia-Agar. 129 Stämme bildeten kein Pigment. 55 der pigmentbildenden Stämme waren  $\alpha'$ -haemolytisch, einer zeigte  $\gamma$ -Haemolyse. Keiner der  $\beta$ -haemolytischen Stämme bildete Pigment. Von den 126 gegen Bacitracin geprüften Stämmen reagierten 96 empfindlich. 91 dieser Stämme waren  $\beta$ -haemolytisch, 5 zeigten  $\alpha'$ -Haemolyse. Einzelheiten sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Pigmentbildung und Bacitracinempfindlichkeit der 185  $\alpha'$ -,  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken-Stämme

| Haemolyseform | n   | Anzahl der Streptokokken-Stämme mit |                        |                                    |                                    |
|---------------|-----|-------------------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|               |     | Pigmentbildung positiv              | Pigmentbildung negativ | Bacitracinempfindlichkeit* positiv | Bacitracinempfindlichkeit* negativ |
| $\alpha'$     | 71  | 55                                  | 16                     | 5                                  | 18                                 |
| $\beta$       | 103 | -                                   | 103                    | 91                                 | 12                                 |
| $\gamma$      | 11  | 1                                   | 10                     | -                                  | -                                  |

\*  $\alpha$  und  $\gamma$ -haemolytische Stämme wurden nicht geprüft (entsprechend MAXTED, 1953). Von den 71  $\alpha'$ -haemolytischen Streptokokken wurden nur 23 Stämme getestet.

Eine Pigmentbildung war bei 55 Stämmen mit  $\alpha'$ -Haemolyse zu verzeichnen, die bei 7 Stämmen jedoch nur schwach ausgeprägt war. Fünf der untersuchten Stämme waren Bacitracin-empfindlich, 18 reagierten nicht. Die 103  $\beta$ -haemolytischen Stämme zeigten keine Pigmentbildung, während 91 empfindlich gegen Bacitracin waren. Von den 11  $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen bildete nur ein Stamm Pigment.

### 3.3.4 Serologische Differenzierung

Bei der serologischen Differenzierung konnten von 383 untersuchten Streptokokken-Stämmen 207 Stämme den serologischen Gruppen A, B, C und L zugeordnet werden (Tabelle 4). Die 176 übrigen Stämme waren nicht einzugruppieren. Von den 207 ein-  
 gruppierbaren Stämmen konnten der serologischen Gruppe A 43 Stämme, der Gruppe B 67, der Gruppe C 96 und ein Stamm der Gruppe L zugeordnet werden. Den Hauptanteil der Streptokokken-Stämme der serologischen Gruppe A stellten die  $\beta$ -haemolytischen Stämme, bei der Gruppe B die  $\alpha'$ -haemolytischen und bei Gruppe C die  $\alpha$ -haemolytischen.

Tabelle 4: Serologische Differenzierung der 383 Streptokokken-Stämme unter Berücksichtigung der Haemolyseformen

| Haemolyse-<br>form | n   | Anzahl der Streptokokken Stämme<br>mit<br>Serologischer Gruppenzugehörigkeit |    |    |    |                  |
|--------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|------------------|
|                    |     | A                                                                            | B  | C  | L* | ohne<br>Ergebnis |
| $\alpha$           | 198 | -                                                                            | -  | 76 | -  | 122              |
| $\alpha'$          | 71  | 1                                                                            | 58 | 6  | -  | 6                |
| $\beta$            | 103 | 42                                                                           | -  | 12 | 1  | 48               |
| $\gamma$           | 11  | -                                                                            | 9  | 2  | -  | -                |

\* Untersuchungsergebnis der Streptokokkenzentrale in Kiel.

Von den 198  $\alpha$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen waren 76 der serologischen Gruppe C zuzuordnen, 122 Stämme konnten

nicht serologisch bestimmt werden. Ein Stamm mit  $\alpha'$ -Haemolyse gehörte der serologischen Gruppe A an, 58 Stämme reagierten mit Antiserum B und 6 mit Antiserum C. 6 Stämme waren nicht eingrupprierbar. 42 der  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken-Stämme waren der serologischen Gruppe A, 12 der serologischen Gruppe C zuzuordnen; ein Stamm gehörte zur serologischen Gruppe L und 48 Stämme waren nicht einzugruppieren. Alle 11 Stämme mit  $\gamma$ -Haemolyse konnten serologisch bestimmt werden: 9 Stämme zeigten Präzipitation mit B-Antiserum und 2 mit C-Antiserum.

#### 4. Diskussion

Da eine Übertragung von B-Streptokokken über die Milch auf den Menschen nicht ausgeschlossen werden kann, wird im Rahmen der Eutergesundheitskontrolle eine eindeutige Diagnostik der B-Streptokokken in Milchproben gefordert. Ein hoher Anteil der in den Milchviehherden auftretenden Galtstreptokokken kann heute von den Eutergesundheitsdiensten diagnostiziert werden. Allerdings treten dennoch öfters Schwierigkeiten bei der Bakteriologischen Untersuchung auf, insbesondere wenn es sich um Streptokokken handelt, die CAMP-negativ und Hippurat-positiv bzw. in beiden Routinetests negativ reagieren. Deshalb wurden 383 Aesculin-negative Streptokokken-Stämme, die aufgrund ihres unterschiedlichen Verhaltens im CAMP- und Hippurat-Test in einem Routinelabor eines Eutergesundheitsdienstes nicht sicher differenziert werden konnten, in den eigenen Untersuchungen außer einer nochmaligen Prüfung im CAMP- und Hippurat-Test weiteren Differenzierungsmöglichkeiten unterzogen. Bei den  $\alpha'$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -haemolytischen Stämmen wurde das Pigmentbildungsvermögen im Columbia-Agar getestet (FALLON, 1974). Die Empfindlichkeit gegen Bacitracin wurde bei allen  $\beta$ -haemolytischen und 23  $\alpha'$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen geprüft (MAXTED, 1953). Zur vollständigen Abklärung erfolgte eine Untersuchung auf serologische Gruppenzugehörigkeit nach LANCEFIELD (1925) in der Gegenstromelektrophorese (EDWARDS und LARSON, 1973; REMMERS, 1975). Die serologische Differenzie-

rung wurde mit Antiseren der serologischen Gruppen A, B und C durchgeführt. 30 Streptokokken-Stämme wurden zur Bestätigung der eigenen Ergebnisse von der Streptokokkenzentrale in Kiel auf verschiedene serologische Gruppen, z.B. auch Gruppe L, geprüft.

Ausdrücklich soll darauf hingewiesen werden, daß mit Ausnahme von drei Stämmen, die schon im Routinelabor als CAMP-positiv erkannt worden waren, nur CAMP-negative Streptokokken in den eigenen Untersuchungen zur Verfügung standen. Deshalb beschränken sich die Aussagen dieser Arbeit im allgemeinen auf die Differenzierung von routinemäßig nicht einzuordnenden Aesculin-negativen Streptokokken. Dabei sollten allerdings nur Verfahren angewandt werden, die auch im Routinelabor durchführbar sind.

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, wurde von den 383 Streptokokken-Stämmen in den eigenen Untersuchungen bei 15 Stämmen ein positives CAMP-Verhalten ermittelt, im Routinelabor waren es nur drei (Tabelle 1). Von diesen 15 Stämmen zeigten 11 Hippuratspaltung; alle 15 konnten aufgrund der serologischen Untersuchung in die Gruppe B eingeordnet werden. Damit wird deutlich, daß aus diesem Untersuchungsmaterial 3,1 % mehr "Galtstreptokokken" (= Streptokokken-Stämme mit positivem CAMP-Test) erkannt wurden, als das entsprechend den Angaben des Vorberichtes möglich war. Die Ergebnisse zeigen außerdem, daß schon bei Vorliegen CAMP-positiver Streptokokken-Stämme - mit oder ohne Fähigkeit zur Hippuratspaltung - eine Zuordnung zu den B-Streptokokken angezeigt ist. Danach Untersuchungen von KUNTER (1967) 3,8 % CAMP-positive nicht in Gruppe B eingeordnet werden können, sind Kriterien wie Haemolyseform und Aeskulinspaltung nicht außer acht zu lassen. Auch HAHN, HEESCHEN und TOLLE (1970) sprechen dem CAMP-Test allein eine Sicherheit von nur 96-98 % zu.

Tabelle 5: Vergleich zwischen den Ergebnissen aus CAMP- und Hippurat-Test sowie der serologischen Differenzierung (n = 383)

| Ergebnisse von CAMP- u. Hippurat-Test | Anzahl | Zugehörigkeit der Streptokokken-Stämme in die serologischen Gruppen |
|---------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------|
| C + H +                               | 11     | 11 x B                                                              |
| C + H -                               | 4      | 4 x B                                                               |
| C - H +                               | 127    | 48 x B<br>14 x C<br>25 x A<br>1 x L<br>39 x n.g. *                  |
| C - H -                               | 241    | 4 x B<br>82 x C<br>18 x A<br>137 x n.g. *                           |

C + = CAMP-positiv, C - = CAMP-negativ,

H + = Hippurat-positiv, H - = Hippurat-negativ

\* nicht eingruppierbar in die geprüften Gruppen

Die meisten der untersuchten Streptokokken-Stämme (96 %) zeigten negatives Verhalten im CAMP-Test, wobei von den Hippurat-positiven 37,8 % in die serologische Gruppe B, 11 % in die Gruppe C und 19,7 % in die Gruppe A eingeordnet werden konnten. Ein Stamm dieser CAMP-negativen und Hippurat-positiven Streptokokken gehörte in die Gruppe L, 30,7 % der Stämme waren nicht in die vorgenannten Gruppen einzuordnen. Auch unter den sowohl CAMP- als auch Hippurat-negativen Stämmen waren B-Streptokokken zu finden, jedoch nur zu 1,7 %. Den Hauptanteil dieser Stämme stellt die serologische Gruppe C mit 34 %, gefolgt von der serologischen Gruppe A mit 7,5 %. 56,8 % der Stämme konnten diesen serologischen Gruppen nicht zugeordnet werden.

In den Tabellen 6 - 9 sind die Eigenschaften der geprüften Streptokokken-Stämme in Beziehung zu der jeweiligen Haemolyseform dargestellt.

Tabelle 6: Verhalten der  $\alpha$ -haemolytischen Streptokokken-Stämme im CAMP- und Hippurat-Test sowie in der serologischen Differenzierung (n = 198)

| Ergebnisse von<br>CAMP- und Hip-<br>purat-Test | Anzahl | Anzahl der Streptokokken-<br>Stämme in den serologischen<br>Gruppen |
|------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------|
| C - H +                                        | 16     | 3 x C<br>13 x n. g. *                                               |
| C - H -                                        | 182    | 73 x C<br>109 x n. g. *                                             |

\* nicht in die geprüften Gruppen eingruppierbar

Von den  $\alpha$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen (Tabelle 6), die alle CAMP-negativ waren, konnte kein Stamm der serologischen Gruppe B zugeordnet werden, vielmehr waren 38,4% der Gruppe C zugehörend, wodurch nach HAHN, HEESCHEN und TOLLE (1970) die Identifizierung als *Streptococcus dysgalactiae* gesichert ist. Den eigenen Ergebnissen entsprechend sind die meisten Stämme der serologischen Gruppe C Hippuratspaltungs-inaktiv, nur 4 % zeigen Hippuratspaltung. Da nach FALLON (1974)  $\alpha$ -haemolytische Streptokokken keine Pigmentbildung zeigen und entsprechend MAXTED (1953) eine gewisse Anzahl der  $\alpha$ -haemolytischen, nicht eingruppierbaren Streptokokken gegen Bacitracin empfindlich ist, wurde für diese Streptokokken auf die entsprechenden Tests verzichtet.

Tabelle 7: CAMP- und Hippurat-Test, Pigmentbildung, Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin und serologische Differenzierung von  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen (n = 103)

| Ergebnisse von CAMP- u. Hippurat-Test | Anzahl | Anzahl der Streptokokken-Stämme |                               |                                         |
|---------------------------------------|--------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|
|                                       |        | Pigmentbildung                  | mit Bacitracinempfindlichkeit | in den serologischen Gruppen            |
| C - H +                               | 53     | 0                               | 50                            | 25 x A<br>5 x C<br>1 x L<br>22 x n. g.* |
| C - H -                               | 50     | 0                               | 41                            | 17 x A<br>7 x C<br>26 x n. g.*          |

\* nicht eingruppierbar in die geprüften Gruppen

Alle 103  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken-Stämme waren - wie auch die  $\alpha$ -haemolytischen - CAMP-negativ. Allerdings fällt eine fast gleichmäßige Verteilung der Hippurat-positiven und -negativen Stämme auf. Von den  $\beta$ -haemolytischen Stämmen waren insgesamt 41 % in die serologische Gruppe A einzuordnen (60 % davon Hippurat-positive, 40 % Hippurat-negative Stämme). Ebenfalls fast gleichmäßig bezüglich des Verhaltens im Hippurat-Test verteilt traten 11,7 % Stämme der serologischen Gruppe C auf. Ein Stamm (ca. 1 %), auch Hippurat-positiv, gehörte in die serologische Gruppe L. Fast 50 % der  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken waren jedoch nicht in die geprüften Gruppen einzuordnen. In keinem Fall war bei den  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken eine Pigmentbildung festzustellen, während eine Empfindlichkeit gegen Bacitracin bei über 90 % vorlag, wobei bis auf eine Ausnahme (41 von 42 Stämmen) die A-Streptokokken diese Eigenschaft aufwiesen. Dieses Ergebnis stimmt mit HAHN, HEE-SCHEN und TOLLE (1970) überein, die bei A-Streptokokken zwischen 80 - 99 % Bacitracinempfindlichkeit angeben. Keinesfalls kann entsprechend den eigenen Untersuchungen die Bacitracin-

empfindlichkeit jedoch als Suchkriterium für die Zugehörigkeit von Streptokokken zur serologischen Gruppe A herangezogen werden, weil außer den A-Streptokokken etwa genau so viele Streptokokken anderer serologischer Gruppen mit erfaßt werden.

Bei  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken spricht also ein negatives Ergebnis sowohl im CAMP- als auch im Pigment-Test und dazu die Feststellung der Bacitracinempfindlichkeit deutlich gegen die Zugehörigkeit zur serologischen Gruppe B. Wie bei den  $\alpha$ -haemolytischen Stämmen kann auch hier nur eine serologische Differenzierung Aufschluß über die Gruppenzugehörigkeit geben.

Zusammenfassend kann für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -haemolytischen Streptokokken festgestellt werden, daß unter diesen kein Stamm der serologischen Gruppe B zu finden war. Zwar lag unterschiedliches Verhalten im Hippurat-Test vor, alle Stämme reagierten jedoch negativ im CAMP-Test.

Tabelle 8: CAMP- und Hippurat-Test, Pigmentbildung, Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin und serologische Differenzierung von  $\alpha'$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen (n = 71)

| Ergebnisse<br>von CAMP-<br>u. Hippurat-<br>Test | Anzahl | Anzahl der Streptokokken-Stämme |                                  |                                    |
|-------------------------------------------------|--------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
|                                                 |        | mit<br>Pigment-<br>bildung      | Bacitracinemp-<br>findlichkeit * | in den<br>serologischen<br>Gruppen |
| C + H +                                         | 8      | 6                               | 0                                | 8 x B                              |
| C + H -                                         | 1      | 1                               | 0                                | 1 x B                              |
| C - H +                                         | 57     | 46                              | 4                                | 47 x B<br>6 x C<br>4 x n.g. **     |
| C - H -                                         | 5      | 2                               | 1                                | 2 x B<br>1 x A<br>2 x n.g. **      |

\* Bacitracinempfindlichkeit wurde nur bei 23  $\alpha'$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen geprüft.

\*\* nicht eingruppierbar in die geprüften Gruppen.

Die 71  $\alpha'$ -haemolytischen Streptokokken-Stämme (Tabelle 8) umfaßten 13 % CAMP-positive Stämme, die restlichen waren CAMP-negativ. Alle CAMP-positiven Streptokokken waren in die serologische Gruppe B einzuordnen, wobei das Ergebnis des Hippurats-Testes unerheblich war. Die CAMP-negativen unter den  $\alpha'$ -haemolytischen (zu 92 % Hippuratspaltungs-aktiv) konnten zu 79 % als B-Streptokokken identifiziert werden, 1,6 % bzw. 9,7 % gehörten in die serologischen Gruppen A bzw. C. Nur 9,7 % waren serologisch nicht einzuordnen. Insgesamt wurden 81,7 % der  $\alpha'$ -haemolytischen Streptokokken serologisch als B-Streptokokken erkannt, wobei 94,8 % dieser B-Streptokokken auch Pigmentbildung zeigten. Keiner der 14 untersuchten B-Streptokokken-Stämme war gegen Bacitracin empfindlich.

Tabelle 9: CAMP- und Hippurat-Test, Pigmentbildung, Empfindlichkeit gegenüber Bacitracin und serologische Differenzierung von  $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken-Stämmen (n = 11)

| Ergebnisse<br>von CAMP-<br>u. Hippurat-<br>Test | Anzahl | Anzahl der Streptokokken-<br>Stämme |                                   |
|-------------------------------------------------|--------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|                                                 |        | mit Pigment-<br>bildung             | in den serolo-<br>gischen Gruppen |
| C + H +                                         | 3      | 0                                   | 3 x B                             |
| C + H -                                         | 3      | 0                                   | 3 x B                             |
| C - H +                                         | 1      | 0                                   | 1 x B                             |
| C - H -                                         | 4      | 1                                   | 2 x B<br>2 x C                    |

Ähnliche Verhältnisse wie bei den  $\alpha'$ -haemolytischen konnten auch bei den  $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken ermittelt werden (Tabelle 9), jedoch war hier die Anzahl der Stämme mit nur 11 wesentlich geringer. 81,8 % (= 9 Stämme) wurden als B-Streptokokken erkannt, nur 8,2 % (= 2 Stämme) wurden in die serologische Gruppe C eingeordnet. Dabei gehörten alle CAMP-positiven und 60 % der CAMP-negativen in die serologische Gruppe B. Der

Hippurat-Test bietet auch hier keine wesentliche Mehrinformation. Pigmentbildung zeigte nur ein Stamm, der sich negativ im CAMP- und positiv im Hippurat-Test verhielt. Dieser Stamm wurde als B-Streptococcus in der serologischen Untersuchung erkannt.

Entgegen der allgemeinen Auffassung, nach der B-Streptokokken mit  $\alpha$ -,  $\alpha'$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Haemolyse auf Rinder- bzw. Schafblutagar wachsen (HAHN, HEESCHEN und TOLLE, 1970; LÜTTICKEN und FRITSCHKE, 1974), konnten bei den B-Streptokokken in den eigenen Untersuchungen (Tabelle 8 und 9) ausschließlich  $\alpha'$ - und  $\gamma$ -Haemolyse festgestellt werden. Auffällig ist weiterhin, daß 52 der insgesamt 67 B-Streptokokken-Stämme kein CAMP-Phänomen aufwiesen. Daß dennoch 15 CAMP-positive Stämme (12 mehr als im Vorbericht, Tabelle 1) festgestellt werden konnten, dürfte durch die sorgfältige Vorbereitung der Blutplatten, insbesondere durch Waschen der Rindererythrozyten und Vorprüfung des Haemolyseverhaltens mittels Referenz-Streptokokken bedingt sein. Denn entgegen den Empfehlungen verschiedener Autoren (MEYER, HESS und BEISSNER, 1978) wurde und wird im Routinelabor mit ständig wechselnden, ungeprüften Blutchargen, meist Schlachtblut, gearbeitet. So können die tatsächlichen, wünschenswerten Haemolyseformen der Streptokokken weder beim Milchausstrich noch beim CAMP-Test einheitlich beurteilt werden, wodurch erhebliche Fehler bei der Auswertung dieses Tests möglich sind.

Um die Bedeutung der fünf verwendeten Kriterien für die Diagnostik der B-Streptokokken besser einschätzen zu können, wurden die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen in der folgenden Tabelle 10 getrennt nach den serologischen Gruppen zusammengestellt.

Tabelle 10: Verhalten der einzelnen serologischen Gruppen im CAMP- und Hippurat-Test, bei der Pigmentbildung und gegenüber Bacitracin (n = 383)

| Serologische Gruppen | Anzahl | CAMP positiv | Hippurat positiv | Pigment positiv | Bacitracin empfindlich** |
|----------------------|--------|--------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| A                    | 43     | 0            | 25               | 0               | 42                       |
| B                    | 67     | 15           | 59               | 56              | 0***                     |
| C                    | 96     | 0            | 14               | 0               | 11                       |
| L                    | 1      | 0            | 1                | 0               | 1                        |
| n.g.*                | 176    | 0            | 39               | 0               | 42                       |

\* nicht eingruppierbar in die geprüften Gruppen

\*\* Bacitracinempfindlichkeit wurde nur bei den  $\beta$ -haemolytischen und 23  $\alpha'$ -haemolytischen Stämmen geprüft.

\*\*\* Bacitracinempfindlichkeit wurde bei 14  $\alpha'$ -haemolytischen B-Streptokokken geprüft.

Es wird nochmals deutlich, daß ein positives CAMP-Verhalten die Eingruppierung in die serologische Gruppe B rechtfertigt, denn in keiner anderen serologischen Gruppe treten CAMP-positive Stämme auf. Allerdings reicht dieser Test keinesfalls aus, um alle B-Streptokokken zu ermitteln. Der Hippurat-Test leistet als Suchtest nur unzulängliche Dienste, da neben den B-Streptokokken auch alle anderen untersuchten serologischen Gruppen Hippuratspaltung aufweisen können; außerdem werden mit ihm ebenfalls nicht alle B-Streptokokken erfaßt. Dagegen bietet die Prüfung der Pigmentbildung erheblich bessere Identifizierungsmöglichkeiten; denn von den B-Streptokokken konnten 84 % als Pigmentbildner erkannt werden, wobei die Tatsache entscheidend ist, daß fast 95 % der  $\alpha'$ -haemolytischen B-Streptokokken Pigment bildeten, und dieses Phänomen bei allen anderen serologischen Gruppen nicht auftauchte. Dieses Ergebnis stimmt mit den Aussagen von MERRITT, TREADWELL und JAKOBS (1976)

überein, die von 3 % "falsch-negativen" Ergebnissen - d.h. B-Streptokokken ohne Pigmentbildungsvermögen - sprechen. Bezieht man die  $\gamma$ -haemolytischen Streptokokken mit ein, so liegt der Prozentsatz an "falsch-negativen" Ergebnissen wesentlich höher (16%), was aber den Aussagen von FALLON (1974) entspricht, der angibt, daß 15 % der haemolytischen B-Streptokokken kein Pigment bilden.

Der Test auf Bacitracinempfindlichkeit erbrachte bei allen 14 darauf geprüften B-Streptokokken-Stämmen negative Ergebnisse, wie das entsprechend den Angaben von POLLOCK und DAHLGREN (1974) zu erwarten war. Diese Autoren fanden nämlich, daß 97,4% aller B-Streptokokken aus menschlichem Untersuchungsmaterial resistent gegen dieses Antibiotikum sind. Als Suchkriterium für B-Streptokokken ist die Bacitracinresistenz dennoch ungeeignet, weil sehr häufig Streptokokken anderer serologischer Gruppen ebenfalls Unempfindlichkeit gegenüber Bacitracin zeigen, wie aus den eigenen Untersuchungen (Tabelle 10) hervorgeht.

Besonders bemerkenswert ist die Beobachtung, daß mehr als 10 % der 383 untersuchten, Aeskulin-negativen, aus Milch isolierten Streptokokken-Stämme in die für den Menschen so bedeutende serologische Gruppe A gehören. Die insgesamt 43 A-Streptokokken-Stämme kamen zumeist aus unterschiedlichen Betrieben, nur wenige (ca. 5 Stämme) wurden anlässlich von Wiederholungsuntersuchungen in identischen Betrieben isoliert. Inwieweit diese Streptokokken aus Kontaminationen der Proben nach der Probenentnahme durch erkrankte Menschen in die Milch gelangt sind oder direkt aus dem Euter stammen, kann nicht sicher beurteilt werden. Zusammenfassend wird jedoch deutlich, daß die Möglichkeit der Verbreitung von A-Streptokokken über die Milch immer noch eine erhebliche Gefahr darstellen kann.

Abschließend kann für die praktische Differenzierung von Aeskulin-negativen Streptokokken folgendes Vorgehen empfohlen werden: Voraussetzung für eine optimale Differenzierung der Streptokokken ist die sorgfältige Vorbereitung des zu

verwendenden Blutagars, insbesondere die Prüfung der Haemolyseeigenschaften des Blutes, um die eindeutige Auswertung der Haemolyseformen beim Wachstum von Streptokokken zu erreichen. Dies gilt auch für die zuverlässigere Aussage des CAMP-Tests.

Die Zuordnung von Streptokokken zur serologischen Gruppe B ist beim Vorliegen des CAMP-Phänomens relativ sicher. Liegen CAMP-negative Stämme vor, so kann die Zugehörigkeit zur serologischen Gruppe B mit dem Test auf Pigmentbildung überprüft werden. In den eigenen Untersuchungen konnten damit 84 % aller B-Streptokokken erfaßt werden. "Falsch-positive" Reaktionen bezüglich Pigmentbildung von Streptokokken anderer serologischer Gruppen können nach den eigenen Untersuchungen nicht vermutet werden. Ist die Zuordnung zur serologischen Gruppe B auch nach dem Pigmentbildungstest nicht möglich, so ist die Durchführung der serologischen Untersuchung angezeigt. Bezüglich der Gruppen A, B, C und G stehen auch handelsübliche Test-Sets zur Verfügung (ROSNER, 1977), die eine problemlose Differenzierung ermöglichen sollen.

## 5. Zusammenfassung

Von 383 Aeskulin-negativen Streptokokken-Stämmen, die im Routinelabor aufgrund des CAMP- und Hippurat-Tests nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden in den eigenen Untersuchungen folgende Zugehörigkeiten zu serologischen Gruppen ermittelt: 11 % der Gruppe A, 17,5 % B, 25 % C und 0,2 % L. Der Rest konnte nicht eingruppiert werden, zumal andere Antiseren nicht einbezogen waren.

22 % der B-Streptokokken zeigten positive Reaktion im CAMP-Test und 84 % bildeten Pigment im Columbia-Agar, während die Streptokokken der übrigen serologischen Gruppen diese Eigenschaft nicht aufwiesen. Deshalb wird vorgeschlagen, den Test auf Pigmentbildung als Suchtest zur B-Streptokokken-Identifizierung CAMP-negativer Streptokokken anzuwenden. Bei negativem Ergebnis sowohl im CAMP- als auch im Pigmenttest sollte die serologische Untersuchung folgen.

Die Prüfungen auf Hippuratspaltung und auf Bacitracinempfindlichkeit können nicht als vereinfachte Methode zur Erkennung der serologischen Gruppenzugehörigkeit angesehen werden, weil diese Eigenschaften bei Streptokokken verschiedener serologischer Gruppen festzustellen sind.

Es wird darauf hingewiesen, daß die sorgfältige Vorbereitung des Blutagars unerlässlich ist für die Auswertung der durch Streptokokken verursachten Haemolyseformen, die Grundlage einer optimalen Streptokokken-Differenzierung sind.

## Summary

383 esculin-negative streptococci were serologically identified, because they could not be exactly differentiated by CAMP-test and hydrolysis of sodium hippurate.

11 %, 17,5 %, 25 %, and 0,2 % respectively were found belonging to group A, B, C, and L. 46 % of all streptococci could not be serologically grouped, because only A, B, C, and L antisera were used. 22 % of the 67 B-streptococci showed a CAMP-phenomenon, 84 % of them produced pigment in Columbia agar. As A, C, L, and the other streptococci showed no pigment production this criterion should be tested as a screening for B-streptococci. CAMP-negative streptococci being unable to produce pigment should be identified serologically, because hydrolysis of hippurate and sensitivity to bacitracin are unspecific reactions.

For a differentiation of streptococci the blood agar must be prepared carefully to allow optimal evaluation of the haemolysis by streptococci.

## 6. Literaturverzeichnis

AYERS, H.S. und P. RUPP (1922):

Differentiation of hemolytic streptococci from human and bovine sources by the hydrolysis of sodium hippurate.

J. Infect. Diseases 30, 388 - 389

BADRI, M.'S., S. ZAWANEH, A. C. CRUZ, G. MANTILLA, H. BAER, W.N. SPELLACY und E.M. AYOUB (1977):

Rectal colonization with group B streptococcus: relation to vaginal colonization of pregnant women.

J. Infect. Diseases 135, 308 - 312

BECHT, H. (1961):

Schweiz. Arch. f. Tierheilk. 103, 12:

zit. nach MEYER, B., E. HESS und H. BEISSNER (1978):

Eine verbesserte Methode zum Nachweis von Sc.agalactiae in der Milch.

Milchwiss. 33, 14 - 15

BEERWERTH, W., A. KÖSER und A. BRÜHN (1965):

Die kulturelle Nachweisbarkeit von pathogenen Streptokokken der Milch und ihre Beziehungen zum Auftreten vermehrten Zellgehaltes.

Milchwiss. 20, 519 - 524

BEUCHE, W., J. SCHULZ und B.-U. SCHMIDT (1978):

Untersuchungen zur Auswirkung von Euterinfektionen mit Streptococcus agalactiae bei hochtragenden Färsen auf die Eutergesundheit post partum und die Milchleistung.

Monatshefte f. Vet.-Med. 33, 201 - 205

BISPING, W. (1973):

Kompodium der veterinärmedizinischen Mikrobiologie.

Verlag M. & H. Schaper, Hannover.

BRAMLEY, A.J., M.F.H. SHEARN und R.G. KINGWILL (1978):

The isolation of Streptococcus uberis from cattle bedding and faeces.

Internat. Dairy Congress, Vol. E. 142-143

CARREL, J. (1978):

Colonization of the pregnant woman and the newborn by group B streptococcus: therapeutic and preventive implications.

Schweiz. Med. Wochenschr. 108, 1197 - 1202

CHRISTIE, R., N.E. ATKINS und E. MUNCH-PETERSEN (1944):

A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci.

Austral. J. Exper. Biol. 22, 197-200

DAJANI, A.S. (1973):

Rapid identification of beta hemolytic streptococci by counter-immunoelectrophoresis.

J. Immunology 110, 1202 - 1205

DAVIS and ROGERS (1939):

A simple confirmatory medium for Streptococcus agalactiae.

J. comp. Path. a. Ther. 52, 132

zit. nach SEELEMANN, M. (1954):

Biologie der Streptokokken

Verlag Hans Carl, Nürnberg

DENEKE, J. und E. KLEINSCHROTH (1978):

Verfahren zur "Verhütung und Bekämpfung von Euterkrankheiten" des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V.

Deutsche Molkerei Zeitung 99, 1770 - 1773

DIERNHOFER, K. (1932):

Aeskulinbouillon als Hilfsmittel für die Differenzierung der Euter- und Milchstreptokokken bei Massenuntersuchungen.

Milchwiss. Forsch. 13, 368

DODD, F.H. und NEAVE, F.K. (1970):

Mastitis control.

Bienn. Rev. natn. Inst. Res. Dairy, 21 - 60

in der deutschen Übersetzung der Fa. Beecham

DURAND, P. und P. GIRAUD (1923):

Les Streptocoques chromogènes.

C. R. Acad. Sci. Paris, 177, 1333-1335

zit. nach FALLON, R.J. (1974).

EBERHARDT, R.J. und J.M. BUCKALEW (1977):

Intramammäre Infektion in einer Milchtierherde mit geringem Vorkommen von Infektionen durch *Sc.agalactiae* und *Staphylococcus aureus*. J A V M A 171, 630 - 634  
ref. Milchwiss. 33, 573 - 574 (1978)

EDBERG, S.C. und S. SAMUELS (1975):

Rapid, colorimetric test for the determination of hippurate hydrolysis by group B streptococcus.  
J. clin. Microbiol. Jan. 76, 49 - 50

EDERER, G.M., M.M. HERRMANN, R. BRUCE, J.M. MATSEN und S.S. CHAPMAN (1972):

Rapid extraction method with Pronase B for grouping beta-hemolytic streptococci.  
Appl. Microbiol. 23, 285 - 288

EDWARDS (1940):

The diagnosis of *Sc.agalactiae* in a liquid selective medium.  
Soc. of Agriculture Bact. Abstr. of Proc. 1938.  
ref. Milchw. Forsch. 20, 196 - 198

EDWARDS, E.A. und G.L. LARSON (1973):

Serological grouping of hemolytic streptococci by counter-immunoelectrophoresis.  
Appl. Microbiol. 26, 899 - 903

FAKLEM, R.R., J.F. PADULA, L.G. THACKER, E.C. WORTHAM und B.J. SCONYERS (1974):

Presumptive identification of group A, B, and D-streptococci.  
Appl. Microbiol. 27, 107 - 114

FALLON, R.J. (1974):

The rapid recognition of LANCEFIELD group B haemolytic streptococci.  
J. clin. Path. 27, 902 - 905

FASCAR, I. (1977):

Änderungen in der Antibiotikaempfindlichkeit von Mastitiserregern und dessen Bedeutung für die Mastitisbekämpfung.

Magyar Allatorvosok Lapja 32, 719 - 722

ref. Der prakt. Tierarzt 3, 242

FERRIERI, P., L.W. WANNAMAKER und J. NELSON (1972):

Localization and characterization of the hippuricase activity of group B streptococci.

Infection and Immunity 7, 747 - 752

FUCHS, P.C., C. CHRISTY und R.N. JONES (1978):

Vielfach CAMP-Test zur vorläufigen Identifizierung von B-Streptokokken.

J.clin.Microbiol. 7, 232 - 233

FULLER, A.T. (1938):

The formamid method for the extraction of polysaccharides from hemolytic streptococci.

Brit. J. exp. Path. 19, 130 - 139

FÜRTMAYR, L. und K. WALSER (1979):

Die Auswirkungen der Behandlung chronischer Mastitiden während der Laktation auf die Mastitissituation in der Herde.

Tierärztl. Umschau 34, 93 - 98

GUENTHER, E., M. GUENTHER, H. KNOELL und W. KOEHLER (1978):

Zur Rolle der B-Streptokokken in der perinatalen Medizin.

Zentralbl. Gynaekol. 99, 1446 - 1451

HAHN, G., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1970):

Streptococcus - Eine Studie zur Struktur, Biochemie, Kultur und Klassifizierung.

Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte 22, 333 - 546

HAHN, G., W. HEESCHEN, J. REICHMUTH und A. TOLLE (1972):

Wechselbeziehungen zwischen Infektionen mit Streptokokken der serologischen Gruppe B bei Mensch und Rind.

Fortschritte der Veterinärmedizin 17, 9. Kongreßber. 189-197

HERTEL, H. (1975):

Einfluß von Zitzendesinfektion und Therapie auf die Mastitishäufigkeit beim Rind.

Schweiz. Milchwirtschaftl. Forsch. 5, 9 - 16

HALLMANN, L. und F. BURKHARDT (1974):

Klinische Mikrobiologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

HILL, H.R., M.E. RITER, S.K. MENGE, D.R. JOHNSON und J.M.

MATSEN (1974):

Rapid identification of group B streptococci by counter-immunoelectrophoresis.

J. of clin. Microbiol. 1, 188 - 191

HOFFMANN, R. (1972):

Untersuchungen über Vorkommen und Bedeutung von Streptokokken unterschiedlicher serologischer Gruppen in der Milch.

Mh. Vet. Med. 27, 472 - 474

HRYNIEWICZ, W., P.B. HECZKO, R. LÜTTICKEN und L.W. WANNAMAKER

(1976):

Comparison of three methods for grouping streptococci.

J. clin. Microbiol. 4, 28-31

HWANG, M. und G.M. EDERER (1974):

Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci.

J. clin. Microbiol. 1, 114 - 115

JOHNSEN, B.A., H. ANKER und F.L. MELENEY (1945):

Science, 102, 376

zit. nach MAXTED, W.R. (1953):

The use of Bacitracin for identifying group hemolytic streptococci.

J. clin. Path. 6, 224-226

KINGWILL, R.G. (1973):

Factors affecting new intramammary infection in dairy cows.

Proceedings of the 12th. Annual meeting of the National mastitis Council, Inc. (U.S.A.) pp. 79 - 84

KHOLY EL, A., L.W. WANNAMAKER und R.M. KRAUSE (1974):  
Simplified extraction procedure for serological grouping of  
beta-hemolytic streptococci.  
Appl. Microbiol. 28, 836 - 839

KLIMMER und SCHÖNBERG (1951):  
Milchkunde und Milchhygiene.  
Verlag M. & H. Schaper, Hannover

KUNTER, E. (1962):  
Die Streptokokken-Präzipitation im Agar-Gel auf dem Objektträger.  
Zbl. Bakt. I Orig. 188, 190 - 194

DERSELBE (1967):  
Zum Nachweis von Galtstreptokokken in Milch.  
Monatshefte für Vet.-Med. 22, 571 - 578

LANCEFIELD, R. (1925):  
The immunological relationship of Streptococcus viridans on  
certain of its chemicals fractions. I. Serological reactions  
obtained with antibacterial sera.  
J. Exp. Med. 42, 377 - 387

DIESELBE (1933):  
Serological differentiation of human and other groups of he-  
molytic streptococci.  
J. Exp. Med. 57, 571 - 595

DIESELBE (1934):  
A serological differentiation of specific types of bovine  
hemolytic streptococci group B.  
J. exper. Med. 59, 441 - 458

DIESELBE (1934):  
Loss of the properties of hemolysin and pigment formation  
without change in immunological specificity in a strain of  
Streptococcus haemolyticus.  
J. exp. Med. 59, 459-469  
zit. nach FALLON, R.J. (1974)

LEIDEL, T. und B. RICHTER (1975):

Bakteriologische Milch- und Umgebungsuntersuchung in einer mittleren Milchviehanlage unter besonderer Berücksichtigung der anaeroben Sporenbildner. - Ein Beitrag zur Verbesserung der Milchhygiene und Eutergesundheit.

Diss. Universität Leipzig

ref. Milchwiss. 32, 168 - 169 (1977)

LUBENOW, E. (1975):

Untersuchungen zu Ätiologie, Verlauf und Diagnostik der subklinischen Mastitis in zwei Milchviehbeständen.

Vet. med. Diss., Gießen

LUCAS, A. und C.D. ROBERTS (1978):

Group B streptococci in pooled human milk (letter)

British med. Journal 1, 919 - 920

LÜTTICKEN, R. und D. FRITSCHKE (1974):

Bestimmung der B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) mit Hilfe des "Dreifachtests" nach WALLERSTRÖM und des CAMP-Tests.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 226, 298 - 304

MAXTED, W.R. (1948):

Extraction of group specific carbohydrate by an enzyme from *Streptomyces albus*.

Lancet 2, 255 - 256

DERSELBE (1953):

The use of Bacitracin for identifying group A hemolytic streptococci.

J. clin. Path. 6, 224 - 226

MCDONALD, J.S., T.J. MCDONALD und A.J. ANDERSON (1977):

Characterization of and bovine intramammary infection by group B *Streptococcus agalactiae* of human origin.

Dairy Sci. abstr. 39, 6640

MERRITT, K. und N.J. JAKOBS (1976):

Improved medium for detecting pigment production by group B streptococci.

J. clin. Microbiol. 4, 379 - 380

MERRITT, K., T.L. TREADWELL und N.J. JAKOBS (1976):

Rapid recognition of group B streptococci by pigment production and counterimmunoelectrophoresis.

J. clin. Microbiol. 3, 287 - 290

MEYER, C. (1978):

Beitrag zum serologischen Nachweis von Streptococcus agalactiae in Herdensammelmilch und seinem Wert als Leitkeim neben der Zellzahl für den Eutergesundheitsdienst in Niedersachsen.

Vet. med. Diss., Hannover

MEYER, B., E. HESS und H. BEISSNER (1978):

Eine verbesserte Methode zum Nachweis von Streptococcus agalactiae in Milch.

Milchwiss. 33, 14 - 15

NEWBOULD, F.H.S. (1975):

The possibilities of eradicating specific infections in mastitis control.

IDF Seminar, Reading, 85, 382 - 388

NEWTON, G.G.F. und E.P. ABRAHAM (1950):

Biochem. J. 47, 257

zit. nach MAXTED, W.R. (1953)

NIELAND, G. (1978):

Die Bekämpfung der subklinischen Mastitits des Rindes in Schleswig-Holstein.

Tierärztl. Umschau 4, 200 - 205

OBIGER, G. (1964):

Zur Pathogenität von B-Streptokokken (Sc.agalactiae) für Mensch und Rind und über experimentelle Infektionen mit humanen Agalactiae-Stämmen an der bovinen Milchdrüse.

Zeitschrift f. Hygiene 149, 446 - 472

zit. nach HAHN, G., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1970)

DERSELBE (1975):

Gruppe B-Streptokokken im Genitale der Frau.

Arch. Gynäk. 218, 65 - 84

OLSEN, S.J. (1975):

Mastitis control system based upon extensive use of mastitis laboratories.

IDF, Annual Bulletin, Reading, 85, 410 - 421

ORLA JENSEN, S. (1919):

The Lactid Acid Bacteria.

Høst. Copenhagen, 116

zit. nach FALLON, R.J. (1974)

OUCHTERLONY, Ö. (1949):

Antigen-Antibody Reactions in Gel.

Acta path. microbiol. Scand. 26, 507

zit. nach KUNTER, E. (1962)

PHILPOT, W.N. (1975):

Prevention of intramammary infection by hygiene.

IDF-Seminar, Reading, 85, 155 - 164

POLLOCK, H.M. und B.J. DAHLGREN (1974):

Distribution of streptococcal groups in clinical specimens with evaluation of Bacitracin screening.

Appl. Microbiol. 27, 141 - 143

RANTZ, L.A. und E. RANDALL (1955):

Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping.

Stanford Med. Bull. 13, 290 - 291

REMMERS, J. (1975):

Bestimmung der B-Streptokokken (Sc.agalactiae) mit Hilfe serologischer Methoden (Präzipitation, FA-Technik) und im CAMP-Test.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 104 - 106

RICHTER, O. (1976):

Zur Mastitissituation in Bayern.

Milchpraxis 14, 26 - 28

RÖTTGER, B. (1977):

Untersuchung zur direkten serologischen Bestimmung von B-Streptokokken (Sc. agalactiae) in Milchproben.

Arch. Lebensmittelhyg. 28, 15 - 17

ROSNER, R. (1977):

Laboratory evaluation of a rapid four-hour serological Grouping of Groups A, B, C, and G Beta-Streptococci by the Phadebact Streptococcus Test.

J. clin. Microbiol. 6, 23-26

SCHALM, O.W., E.J. CARROL und N.C. JAIN (1971):

Bovine Mastitis.

zit. nach HENKER, K.-E. (1974):

Sanierung galtnifizierter Kuhherden durch Kombination von Hygienemaßnahmen, Therapie und Ausmerzung.

Tierärztl. Umschau 9, 470

VAN DER SCHEER (1941):

Over mastitis veroorzakende Streptococcen.

N. V. Drukkerij M. Wyt und Zonen, Rotterdam

zit. nach SEELEMANN, M. (1954):

Biologie der Streptokokken.

Verlag Hans Carl, Nürnberg

SEELEMANN, M. (1954):

Biologie der Streptokokken.

Verlag Hans Carl, Nürnberg

SKALKA, B., J. SMOLA und J. PILLICH (1979):

Die Verwendbarkeit der haemolytisch aktiven "Exosubstanz" von Corynebakterium pseudotuberculosis bei der Isolierung und Bestimmung von Streptococcus agalactiae und ihr Vergleich mit dem beta-Toxin von Staphylococcus aureus.

Zbl. vet. Med. B, 26, 679 - 687

TIERGESUNDHEITSDIENST TRAUNSTEIN (1979):

Ermittelte Galtbetriebe von 1976 - 1978.

Unveröffentlichte Statistik

WEIGT, U. und D. AHLERS (1978):

Schwere Mastitiden im späten Stadium der Laktationsruhe und zum Abkalbetermin.

Tierärztl. Umschau 33, 320 - 324

WEISER, W. (1979):

Streptokokkenisolierungen aus Organen von not- und krankgeschlachteten Rindern und Kälbern im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung.

Arch. Lebensmittelhyg. 30, 157 - 196

WIESNER, H.-U. (1974):

Persönliche Mitteilung.

WIESNER, H.-U. (1979):

Serologischer Nachweis von B-Streptokokken in Herdensammel-milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 30, 46 - 48

WILKINSON, H.W. (1977):

CAMP-DISK-Test zur vorläufigen Identifizierung von Streptokokken der serologischen Gruppe B.

J. clin. Microbiol. 7, 42 - 45

WILSON, C.D. (1975):

A practical mastitis control routine.

IDF-Seminar, Reading, 85, 422 - 438

ZAADHOF, K.-J. und G. TERPLAN (1971):

Zur Diagnose von Galtstreptokokken im TKT-Medium und CAMP-Test unter Verwendung des Columbia-Agar-Grundsubstrats.

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 114 - 115

## L e b e n s l a u f

Name: Angelika Richter-Meerwald

geboren: 25. Oktober 1950 in Bischofswiesen/Obb.

Wohnort: Bischofswiesen, Hochkalterstr. 7

Eltern: Horst Richter-Meerwald, med.wiss. Mitarbeiter, und Waltraud Richter-Meerwald, geb. Meerwald, Hausfrau

Schule: 1957-1961 Volksschule Bischofswiesen  
1961-1962 Realgymnasium in Berchtesgaden  
1962-1970 Städt. Realgymnasium in Erlangen  
1970 Abitur am Städt. Realgymnasium in Erlangen

Studium: 1970-1975 9 Semester Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover  
1975 Tierärztliche Prüfung  
1976 (Febr.) Approbation

Beruf: Tierärztin

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Annahme des Themas und seine Anregungen bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Ebenso danke ich Herrn Dr. F. Meinel und Herrn Dr. H.-H. Grove für die jederzeit gewährte Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. HAHN (Streptokokkenzentrale in Kiel) für seine Bemühungen.

Bei den Mitarbeitern des Instituts und den Mitarbeitern des Tiergesundheitsdienstes Traunstein möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.





